



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular
Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM)

**FUNCIÓN ONCOGÉNICA DEL INHIBIDOR DE LA H⁺-ATP
SINTASA, IF1: DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE MODELOS
TRANSGÉNICOS CONDICIONALES Y TEJIDO-ESPECÍFICOS**

Memoria presentada por la licenciada
Laura Mercedes Sánchez Cenizo
para optar al grado de
Doctora en Biología Molecular
por la Universidad Autónoma de Madrid

Director de Tesis: **Dr. José Manuel Cuezva Marcos**

Madrid, 2014

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio del Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM) del Doctor José Manuel Cuezva Marcos, Catedrático del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid (Septiembre 2007-Agosto 2011). Durante este periodo, la licenciada Laura Mercedes Sánchez Cenizo ha disfrutado de una Beca predoctoral de la Fundación “Severo Ochoa” (Septiembre 2007-Agosto 2008) y de una beca (Septiembre 2008-Agosto 2010)/contrato (Septiembre 2010-Agosto 2011) predoctoral del Programa Nacional de Formación de Personal Investigador.

A Carmen.

*Luchadora, humilde,
sabia y querida abuela.*

*Vivir no es sólo existir,
sino existir y crear,
saber gozar y sufrir
y no dormir sin soñar.
Descansar, es empezar a morir.*

Gregorio Marañón

AGRADECIMIENTOS

Seis años y medio después de poner el primer pie en el laboratorio me enfrento a la página en blanco de Agradecimientos. Son muchas las personas que, de un modo u otro, han formado parte de esta Tesis y no quisiera olvidarme de ninguna. A todos aquellos que echen de menos su nombre en esta página, gracias también pues sin duda, si están leyendo esto, forman parte de esas personas a las que tengo algo que agradecer.

En primer lugar, debo dar las gracias a mi Director de Tesis, Pepe Cuezva, por su confianza y ayuda. Gracias por enseñarme a pensar críticamente, a encarar dificultades y celebrar satisfacciones, a mostrarme lo que es la Ciencia en definitiva.

Para llevar a cabo esta Tesis, ha sido indispensable la colaboración y el trabajo de muchas personas. Muchas gracias al Dr. Manuel González Barón y al equipo que dirige en el Hospital La Paz, por la colección de muestras de pacientes de carcinoma de mama y por los datos clínicos y de seguimiento de los pacientes. Quiero agradecer al Dr. Pedro Fernández, del IDIBAPS en el Hospital Clinic, por suministrarnos las muestras de carcinomas y de tejido normal del mismo paciente. También quiero agradecer al Dr. José J. Lucas por la línea transgénica CamKIIalpha-tTA y a Álvaro D. Ortega y Paula García-Huerta por las construcciones del mutante H49K.

Gracias al personal de Servicios Generales y de Investigación del CBMSO y otras Instituciones asociadas por su excelente labor y facilitación del trabajo del día a día: A Javier Palacín y a todo el personal del Animalario, en especial a María Eugenia y Marta, por su paciencia y colaboración. A Fernando Carrasco, del Servicio de Genómica, por facilitarme enormemente el trabajo de genotipaje. A Belén Pintado (CNB) del Servicio de Transgénesis por su consejo y participación en la obtención de las líneas transgénicas.

Un lugar de honor se merecen mis compañeros de laboratorio porque realmente sin ellos no lo habría conseguido. A mi “hermana” María, que desde el día uno hasta la maquetación de esta Tesis ha estado a mi lado, enseñándome lo que sé (y lo que no sé también), aconsejándome y apoyándome en todo momento. A mi tocaya italiana Laura, por nuestras horas de animalario, nuestro IF1 querido y sobre todo por su sentido del humor que siempre me ha arrancado una sonrisa. A Margarita por cuidarnos y regañarnos como una madre a todos; en ningún otro laboratorio la Navidad ha sido tan especial como en el 326. A mi “primita” Cris, por hacerme caso y tomarme el pelo a partes iguales. A Fulvio, por cuidarme y aguantar mis explicaciones como si fuesen importantes. A Imke, compañera de esta aventura desde el principio por su actitud

positiva ante la vida. Al resto de compañeros que han pasado por el 326 por el buen ambiente que conseguimos generar: Dani, Marcos, Santi, Inma, Javi, Marta... Y a todos nuestros vecinos que nos visitaban y contribuían: Enrique, Nacho, Javi, Alain, Elise, y Araceli. ¡Hay tradiciones, como las de los viernes, que no deberían perderse nunca!

A mi familia, que sin entender absolutamente nada de a lo que me dedicaba, siempre se preocupaba y me animaba a continuar adelante (no, todavía no he descubierto la vacuna contra el cáncer). En especial a mis padres, por inculcarme la cultura del esfuerzo, la responsabilidad y la valentía con la que siempre se llega a buen puerto en la vida. Lo habéis hecho bien.

Lucía, Marina, Rosa, mis tres fieles mosqueteras, ellas saben que siempre les estaré agradecidas por ser mi punto de equilibrio, mi familia y mi alegría. Sé que hoy están a mi lado para celebrar igual que están para confortar. También a mis farmacéuticas favoritas Marta y Teresa, mi amiga del alma en la distancia Martita, mes amies françaises Laura y Sarah, mis becarios favoritos Irene, Bea, Kike, Juan, Roberto, Sonia,.... gracias a todos por vuestro apoyo.

Y por último a ti, que eres la felicidad de mi vida. Te agradezco que finalmente hayas asumido lo que esta Tesis representa y hayas andado conmigo todo este camino.

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AESBF	4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato
ALT	Alanina aminotransferasa
AMPK	Proteína kinsa activada por AMP
ANT	Adenín-nucleótido translocasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BEC	(Índice) Bioenergético celular
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> , albúmina sérica bovina
CaM	Calmodulina
CamKII α	Calcio-calmodulina kinasa II α
CBMSO	Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa»
CCCP	Carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
cDNA	DNA cíclico
CEBP β	<i>CCAAT Enhancer-binding protein beta</i> , proteína de unión al enhancer CCAAT beta
ChIP	<i>Chromatin Immunoprecipitation</i> , inmunoprecipitación de cromatina
Cit	Citocromo
CMV	Citomegalovirus
COX	Citocromo Oxidasa
CTE	Cadena de Transporte de Electrones
Ctr	Control
DEN	N-dimetilnitrosamina
dH ₂ O	Agua destilada
DNPH	Dinitrofenilhidracina
dNTP	desoxi-nucleótidos trifosfato
Dox.	Doxiciclina
DTT	Ditiotreitol
FBS	<i>Fetal Bovin Serum</i> , suero fetal bovino
FCCP	Cianuro de p-trifluorometoxifenilhidrazona
G3BP	<i>GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein</i> , proteína de unión a la proteína activadora de GTPasa

G6PDH	Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , proteína verde fluorescente
Glu	Glucosa
H ⁺	Protón; Ratón que contiene el transgén H49K
H49K	Mutante de IF1 (con sustitución de histidina por lisina en posición 49)
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i> , lipoproteína de alta densidad
h-IF1	IF1 humano
HK	Hexokinasa
hMSC	<i>human Mesenchymal Stem Cells</i> , células mesenquimáticas humanas
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , cromatografía líquida de alta resolución
HR	<i>Hazard Ratio</i> , proporción de riesgo
hsp60	<i>Heat-shock protein 60</i> , proteína de estrés térmico 60
I ⁺	Ratón que contiene el transgén IF1 humano
<i>IER-3</i>	<i>Immediate early response gene3</i> , gen de respuesta temprana inmediata 3
<i>IEX-1</i>	<i>Immediate Early Gene X1</i> , gen de respuesta temprana inmediata X1
IF1	<i>Inhibitory Factor 1</i> , factor inhibitorio 1
IgGs	Inmunoglobulinas
iPS	<i>induced Pluripotent Stem (cells)</i> , (células) pluripotentes inducidas
IPTG	Isopropil-beta-D-tiogalactopiranósido
KO	<i>Knock-Out</i>
LAP	<i>Liver Activated Protein</i> , proteína hepática activada
LDH	Lactato deshidrogenasa
MEFs	<i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i> , fibroblastos embrionarios de ratón
MINOS	<i>Mitochondrial Inner Membrane Organizing System</i> , Sistema de organización de la membrana interna mitocondrial
MK	Miokinasa
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH DH	NADH deshidrogenasa
nDNA	DNA nuclear
<i>NF-YA</i>	<i>Nuclear transcription factor Y subunit alpha</i> , factor de transcripción Y subunidad alfa

NF-YB	<i>Nuclear transcription factor Y subunit beta</i> , factor de transcripción Y subunidad beta
NFκB	<i>Nuclear Factor-kappaB</i> , factor nuclear kappaB
Ni-NTA	níquel-ácido nitrilotriacético
NRF1	<i>Nuclear respiratory factor 1</i> , factor respiratorio nuclear 1
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
OL	Oligomicina
ORF	<i>Open Reading Frame</i> , marco abierto de lectura
OXPHOS	<i>OXidative PHOSphorilation</i> , fosforilación oxidativa
p-AMPK	<i>phospho-AMPK</i> , proteína AMPK fosforilada
PC	Piruvato carboxilasa
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reacción en cadena de la polimerasa
PET	<i>Positron Emission Tomography</i> , tomografía de emisión de positrones
PFA	Paraformaldehído
pI	Punto Isoeléctrico
PK	Piruvato kinasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
r-IF1	IF1 recombinante
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , especies reactivas de oxígeno
ROT	Rotenona
RSO	Respiración Sensible a Oligomicina
rtTA	Transactivador reverso
S.E.M.	<i>Standard Error of the Mean</i> , error estándar de la media
SDH	Succinato Deshidrogenasa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SG	Supervivencia Global
siRNA	RNA de silenciamiento
SLE	Supervivencia Libre de Enfermedad
SOD-2	Superóxido Dismutasa-2
T ⁺	Ratón que contiene el transactivador
T ⁺ /H ⁺	Ratón doble transgénico para el transactivador y para H49K
T ⁺ /I ⁺	Ratón doble transgénico para el transactivador y para IF1 humano
T _a	Temperatura de anillamiento

TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tet	Tetraciclina
TGF β	<i>Transforming growth factor beta</i> , factor de crecimiento transformante beta
T _m	Temperatura de fusión (<i>melting</i>)
TMRM ⁺	Tetrametil-rodamina-metil-éster
TRE	<i>Tetracycline Responsive Element</i> , elemento de respuesta a tetraciclinas
tTA	Transactivador
u.a.	Unidades arbitrarias
UCP-2	<i>Uncoupling protein 2</i> , proteína desacoplante 2
UI	Unidades Internacionales
UTR	<i>UnTranslated Region</i> , región no traducida
UV	Ultravioleta
V _{max}	Velocidad máxima de reacción
wt	<i>Wild type</i> , genotipo salvaje
$\Delta\Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY.....	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. LA MITOCONDRIA.....	11
1.1.1. Morfología mitocondrial.....	11
1.1.2. Las mitocondrias como productores energéticos	12
1.1.3. Mitocondria y cáncer	14
1.2. LA H⁺-ATP SINTASA MITOCONDRIAL.....	17
1.2.1. Estructura	17
1.2.2. Mecanismo de acción	18
1.2.3. Regulación	20
1.3. EL INHIBIDOR FISIOLÓGICO DE LA ATP SINTASA: IF1.....	20
1.3.1. Homología.....	22
1.3.2. Regulación de IF1.....	22
1.3.3. Estructura de IF1 e interacción con β F1ATPasa	23
1.3.3.1. Estructura de IF1 y análisis de su secuencia	23
1.3.3.2. Interacción de IF1 con β F1ATPasa	25
1.3.3.3. IF1 y dimerización de β F1ATPasa.....	26
1.3.4. Mecanismo de acción	27
1.3.5. Funciones de IF1	28
1.3.5.1. Isquemia cardiaca.....	29
1.3.5.2. Muerte celular	30
1.3.5.3. Diferenciación/desdiferenciación celular.....	30
1.3.5.4. Cáncer.....	30
1.3.5.5. Otras funciones de IF1	31

2.	OBJETIVOS	33
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1.	MATERIALES	39
3.1.1.	Muestras humanas	39
3.1.2.	Líneas celulares.....	39
3.1.3.	Ratones	40
3.1.4.	Bacterias	40
3.1.5.	Plásmidos.....	40
3.1.6.	Anticuerpos.....	40
3.1.7.	Oligonucleótidos.....	40
3.1.8.	Otros materiales	42
3.2.	MÉTODOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR.....	42
3.2.1.	Clonaje, expresión y purificación de la proteína IF1 recombinante (r-IF1)	42
3.2.2.	Generación de anticuerpos poli y monoclonales anti-IF1.....	43
3.2.3.	Aislamiento y purificación de DNA	44
3.2.4.	Cuantificación y calidad de DNA aislado y purificado	44
3.2.5.	Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	44
3.2.6.	Obtención y purificación del DNA transgénico para la microinyección pronuclear.....	44
3.2.7.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	45
3.2.7.1.	<i>Amplificación para clonaciones</i>	<i>45</i>
3.2.7.2.	<i>Cribado de clones recombinantes.....</i>	<i>45</i>
3.2.7.3.	<i>Mutagénesis dirigida</i>	<i>46</i>
3.2.7.4.	<i>Genotipado</i>	<i>46</i>
3.2.8.	Clonaciones.....	46
3.2.8.1.	<i>pCMV•SPORT6-H49K.....</i>	<i>47</i>
3.2.8.2.	<i>pBI-L-IF1 y pBI-L-H49K</i>	<i>47</i>
3.2.8.3.	<i>pTRE2hyg-IF1 y pTRE2hyg-H49K.....</i>	<i>47</i>

3.3.	MÉTODOS EN BIOQUÍMICA	47
3.3.1.	Extracción y cuantificación de proteínas de muestras biológicas	47
3.3.2.	Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida y western blot	48
3.3.3.	Determinación de la carbonilación de proteínas en hígado de ratón	49
3.3.4.	Determinación de la concentración de lactato	49
3.3.5.	Determinación de metabolitos en sangre/suero de ratón	49
3.3.6.	Determinación de la concentración de metabolitos en hígado de ratón	50
3.4.	MÉTODOS EN BIOLOGÍA CELULAR.....	50
3.4.1.	Cultivo celular	50
3.4.2.	Transfección de plásmidos y silenciamiento	51
3.4.3.	Tratamientos celulares.....	51
3.4.4.	Medida del flujo glucolítico	52
3.4.5.	Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$).....	52
3.4.6.	Citometría de flujo	52
3.4.7.	Medida de la actividad luciferasa	53
3.4.8.	Inmunofluorescencia	53
3.4.9.	Medida del consumo de oxígeno en células	53
3.4.10.	Inmunohistoquímica	54
3.5.	MÉTODOS EN RATONES	55
3.5.1.	Condiciones generales de cuidado, mantenimiento y manejo de ratones	55
3.5.2.	Microinyección pronuclear	56
3.5.3.	Inducción de la expresión transgénica con doxiciclina	56
3.5.4.	Inducción de carcinogénesis hepática con N-dietilnitrosamina (DEN)	56
3.5.5.	Extracción y procesamiento de sangre y órganos de ratón	57
3.5.6.	Aislamiento de mitocondrias de hígado de ratón	57
3.5.7.	Medida del consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado de ratón.....	58
3.5.8.	Medida de la actividad citocromo c oxidasa en mitocondrias de ratón	58

Índice

3.6.	MÉTODOS ESTADÍSTICOS	58
3.6.1.	Análisis de la significatividad	58
3.6.2.	Análisis de supervivencia	59
3.6.3.	Agrupamiento jerárquico (clustering)	59
4.	RESULTADOS	61
4.1.	FUNCIÓN BIOLÓGICA DE IF1	63
4.1.1.	Generación de anticuerpos monoclonales anti-IF1	63
4.1.2.	Expresión diferencial de IF1 en distintos tejidos murinos y humanos	63
4.1.3.	La sobreexpresión de IF1 en células de rata, ratón y humanas produce una estimulación de la glucólisis aeróbica	65
4.1.4.	La sobreexpresión de IF1 en células de rata, ratón y humanas produce un aumento en el potencial de membrana mitocondrial	67
4.1.5.	La sobreexpresión de IF1 promueve la inhibición de la actividad de la H^+ -ATP sintasa	68
4.1.6.	El silenciamiento de IF1 en células humanas disminuye el flujo glucolítico aeróbico y activa la fosforilación oxidativa	69
4.2.	RELEVANCIA BIOLÓGICA DE IF1 EN CÁNCER	70
4.2.1.	Expresión de IF1 en tumores humanos	70
4.2.1.1.	<i>Análisis de la expresión de IF1 en carcinomas de mama, colon y pulmón mediante western blot</i>	<i>70</i>
4.2.1.2.	<i>Análisis de la expresión de IF1 en carcinomas de mama, colon y pulmón mediante inmunohistoquímica</i>	<i>71</i>
4.2.2.	F1 como marcador de progresión tumoral en adenocarcinoma de mama	71
4.3.	MODELO ANIMAL DE INTERFERENCIA CON LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	78
4.3.1.	Generación de ratones transgénicos tetO-IF1 y tetO-H49K	78
4.3.2.	Modelo animal de sobre-expresión condicional de H49K en hígado: caracterización de la expresión	83
4.3.3.	La expresión de H49K en hígado interfiere la fosforilación oxidativa	84
4.3.4.	La expresión de H49K en hígado disminuye la carga energética celular	86
4.3.5.	Los ratones que expresan H49K desarrollan hipoglucemia	87

4.3.6.	Sobre-expresión hepática de H49K y estrés oxidativo	90
4.3.7.	El modelo Tet Off de sobre-expresión de H49K confirma los hallazgos fenotípicos observados en el modelo Tet On.	92
4.3.8.	Sobre-expresión hepática de H49K y carcinogénesis.....	94
5.	DISCUSIÓN.....	97
5.1.	IF1 ESTÁ DIFERENCIALMENTE EXPRESADO EN CÉLULAS Y TEJIDOS MURINOS Y HUMANOS	99
5.2.	IF1 INHIBIE LA ACTIVIDAD ATP SINTASA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS	100
5.3.	IF1-H49K INHIBE LA ACTIVIDAD ATP SINTASA MITOCONDRIAL IN VIVO	102
5.3.1.	Modelo animal de inhibición de OXPHOS a través de la sobre-expresión de H49K	102
5.3.2.	Inhibición de la OXPHOS y cáncer	104
5.3.3.	Papel de IF1 en cáncer	106
6.	CONCLUSIONES	109
	BIBLIOGRAFÍA	113
	ANEXO I - Material Adicional	151
	ANEXO II - Publicaciones.....	169

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Estructura interna y ultraestructura mitocondrial.....	11
Figura 2:	Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa mitocondrial.	13
Figura 3:	Características fenotípicas de la célula tumoral	14
Figura 4:	Estructura y funcionamiento de la H ⁺ -ATP sintasa mitocondrial	19
Figura 5:	Características principales de IF1	21
Figura 6:	Esquema de la generación de ratones transgénicos <i>tetO-IF1</i> y <i>tetO-H49K</i>	56
Figura 7:	Generación de anticuerpos anti-IF1 a partir de la proteína IF1 recombinante	64
Figura 8:	Niveles de expresión de IF1 y β F1 en tejidos murinos y humanos	64
Figura 9:	Efecto de IF1 y H49K en el flujo glucolítico de células de rata, ratón y humanas	66
Figura 10:	Falta de efecto en flujo glucolítico de IF1 o H49K en células con alto nivel endógeno de IF1	66
Figura 11:	Efecto de IF1 y H49K en el potencial de membrana mitocondrial de células de rata, ratón y humanas.....	67
Figura 12:	Falta de efecto en potencial de membrana de IF1 o H49K en células con alto nivel endógeno de IF1	68
Figura 13:	Efecto de IF1 y H49K en la respiración mitocondrial de células de rata	68
Figura 14:	Efecto del silenciamiento de IF1 y H49K en el flujo glucolítico y en la actividad H ⁺ -ATP sintasa de células con alto nivel endógeno de IF1.....	69
Figura 15:	Expresión de IF1 en tejidos normales y tumorales por <i>western blot</i>	70
Figura 16:	Expresión de IF1 en tejidos normales y tumorales humanos por inmunohistoquímica.	71
Figura 17:	Niveles de distintos marcadores moleculares y supervivencia libre de enfermedad en pacientes con baja y alta expresión de IF1	73
Figura 18:	Agrupamiento jerárquico no supervisado de IF1 y del índice bioenergético celular	76
Figura 19:	Esquema de los fragmentos génicos microinyectados	78
Figura 20:	Esquema del funcionamiento del sistema <i>Tet On</i> y <i>Tet Off</i> en ratones transgénicos	80
Figura 21:	Expresión transgénica en las líneas fundadoras <i>tetO-IF1</i> y <i>tetO-H49K</i> en distintos tejidos.....	81
Figura 22:	Expresión de H49K en hígado en la línea <i>tetO-H49K-25</i> por <i>western blot</i>	83
Figura 23:	Expresión de H49K en hígado de la línea <i>tetO-H49K-25</i> por inmunohistoquímica ...	84
Figura 24:	Respiración de mitocondrias aisladas de hígado de ratón	85
Figura 25:	Complejos respiratorios en extractos hepáticos.....	86
Figura 26:	Carga energética celular en hígado de ratones adultos.....	87
Figura 27:	Expresión de AMPK y p-AMPK en hígado de ratones adultos	87
Figura 28:	Glucemia y lactato en sangre de ratones de 0 días de edad, 15 días de edad y adultos	88
Figura 29:	Acilcarnitinas en sangre.....	89

Figura 30: Ácidos orgánicos en extractos hepáticos	91
Figura 31: Expresión de proteínas antioxidantes en extractos hepáticos de ratones de 15 días de edad.....	91
Figura 32: Carbonilación de proteínas en extractos hepáticos de ratones de 15 días de edad .	92
Figura 33: Expresión condicionada de H49K en hígado, modelo <i>Tet Off</i>	93
Figura 34: Respiración de mitocondrias aisladas de hígado de ratón, modelo <i>Tet Off</i>	93
Figura 35: Complejos respiratorios en extractos hepáticos, modelo <i>Tet Off</i>	94
Figura 36: Peso y afectación hepática tras tratamiento con N-dietilnitrosamina (DEN) en el modelo <i>Tet Off</i>	95
Figura 37: Efecto hepatocarcinogénico de N- dietilnitrosamina (DEN) en el modelo <i>Tet Off</i>	96
Figura 38: IF1 es un regulador del metabolismo energético celular	106

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Homología entre las secuencias proteicas del inhibidor de la ATPasa en distintas especies eucariotas	22
Tabla 2: Plásmidos	41
Tabla 3: Anticuerpos primarios	43
Tabla 4: Oligonucleótidos.....	43
Tabla 5: Resumen de las características clínico-patológicas, índice bioenergético y nivel de expresión de IF1 en la cohorte de pacientes de adenocarcinoma de mama estudiados	72
Tabla 6: Análisis univariante de la supervivencia en la cohorte de pacientes de adenocarcinoma de mama estudiados	73
Tabla 7: Análisis de Kaplan-Meier univariante de la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes estratificados por la expresión tumoral de IF1.....	74
Tabla 8: Análisis de Kaplan-Meier univariante de la supervivencia global de los pacientes estratificados por la expresión tumoral de IF1	74
Tabla 9: Análisis multivariante por regresión de Cox de la supervivencia libre de enfermedad ...	77
Tabla 10: Eficiencia de la técnica de microinyección pronuclear	79
Tabla 11: Resumen de la prueba de expresión de las líneas fundadoras <i>tetO-IF1</i> y <i>tetO-H49K</i>	82
Tabla 12: Concentración de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados en sangre de ratones adultos.....	90

RESUMEN

RESUMEN

IF1 es una pequeña proteína mitocondrial con una actividad regulada por pH que interacciona con la H⁺-ATP sintasa bloqueando su mecanismo de catálisis cuando la enzima se encuentra funcionando en modo reverso, translocando H⁺ al espacio intermembrana e hidrolizando ATP. En este estudio se demuestra por primera vez que IF1 es capaz de inhibir la *síntesis* de ATP de la H⁺-ATP sintasa ya que su sobre-expresión en células de mamífero produce un aumento del flujo glucolítico y del $\Delta\Psi_m$ y una reducción de la respiración sensible a oligomicina (RSO). Por el contrario, su silenciamiento disminuye el flujo glucolítico y aumenta la RSO. Es decir, IF1 es un regulador clave del metabolismo energético de la célula. Además, IF1 se encuentra diferencialmente expresado en distintos tipos celulares y tejidos murinos y humanos. Los tumores humanos de mama, colon y pulmón presentan unos niveles significativamente elevados de IF1 respecto a los correspondientes tejidos normales. Sorprendentemente, un nivel bajo de expresión de IF1 es un marcador pronóstico de supervivencia libre de enfermedad que correlaciona con un mayor riesgo de aparición de metástasis. De cualquier manera, IF1 es una proteína esencial para el mantenimiento del fenotipo metabólico del cáncer.

En el contexto de la regulación metabólica, la sobre-expresión de IF1 o su forma mutante H49K permite generar modelos murinos de patologías que cursan con una disfunción de la OXPHOS. El mutante de IF1, H49K, que carece de regulación por pH, es idóneo para estudiar la inhibición de la H⁺-ATP sintasa en tejidos con un elevado contenido endógeno de IF1 como es el caso del hígado. Se han generado ratones transgénicos *tet-O-IF1* y *tet-O-H49K* que expresan la proteína transgénica humana IF1 o H49K de forma tejido-específica y regulada por doxiciclina. En concreto, se ha caracterizado un modelo de interferencia con la OXPHOS hepática mediada por la sobre-expresión condicional de H49K. En este modelo se demuestra, *in vivo*, que H49K inhibe la actividad sintasa de la ATPasa. El contenido hepático de ATP de los ratones que sobre-expresan este inhibidor está disminuido, con una consecuente activación de AMPK. Además, sus mitocondrias hepáticas muestran una respiración disminuida y con un defecto secundario en la actividad del complejo IV. Estos ratones presentan alteraciones metabólicas sistémicas como es la reducción de la glucemia y la lactacidemia. La inducción de hepatocarcinogénesis con N-dimetilnitrosamina (DEN) produce un mayor número de tumores en los ratones que sobre-expresan H49K, poniendo de manifiesto que la limitación de la OXPHOS favorece la transformación tumoral, apoyando el papel de IF1 en cáncer.

En conclusión, IF1 se comporta como un regulador de la OXPHOS que contribuye a perfilar el metabolismo energético de la célula. Los ratones transgénicos generados permitirán estudiar el efecto de la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial en distintos tejidos como modelo de distintas patologías mitocondriales. Los resultados aquí mostrados aportan, además, nuevas evidencias de la participación de la inhibición de la H⁺-ATP sintasa en cáncer.

SUMMARY

SUMMARY

IF1 is a small mitochondrial pH-regulated protein that interacts with H⁺-ATP synthase blocking its catalytic mechanism when the enzyme is working in reverse, translocating H⁺ to the intermembrane space and hydrolyzing ATP. This work demonstrates, for the first time, that IF1 is able to inhibit the *synthesis* of ATP by the H⁺-ATP synthase since its overexpression in mammalian cells increases the glycolytic flux and the $\Delta\Psi_m$ and reduces the oligomycin sensitive respiration (OSR). Conversely, IF1 silencing reduces the glycolytic flux and increases OSR. Therefore, IF1 is a key regulator of energy metabolism of the cell. Moreover, IF1 expression is largely variable between different cell types and human and mouse tissues. Breast, colon and lung tumors express a significantly higher amount of IF1 compared to their normal tissue counterparts. Surprisingly, a low expression of IF1 is a marker of bad prognosis that correlates with a higher risk of metastasis. In any case, IF1 is an essential protein in the maintenance of the metabolic phenotype of cancer.

In the context of metabolic regulation, the overexpression of IF1 or of its mutant H49K offers valuable tools to enable the generation of murine models to emulate pathologies based on OXPHOS deficiencies. H49K is an IF1 mutant that is not regulated by pH and, thus, it is especially suitable for studying the inhibition of the H⁺-ATP synthase in tissues with high endogenous content of IF1, as it is the case of liver. The generated transgenic mice *tet-O-IF1* and *tet-O-H49K* express the human transgenic proteins IF1 or H49K in a tissue-specific and doxycycline-dependent manner. Specifically, this work describes a model of OXPHOS interference in liver via conditional overexpression of H49K. This transgenic model demonstrates that H49K inhibits the synthase activity of the ATPase *in vivo*. Liver ATP content of mice overexpressing H49K is diminished and, consequently, AMPK is activated. Moreover, liver mitochondria display a reduced respiration concomitant with a secondary impairment of complex IV activity. These mice show metabolic defects like a decreased blood glucose and lactate concentration. The hepatocarcinogenic agent N-diethylnitrosamine (DEN) induces a higher number of tumors in mice that overexpress H49K, evidencing that OXPHOS impairment favors tumor transformation, emphasizing the involvement of IF1 in cancer.

Summarizing, IF1 behaves as an OXPHOS regulator that contributes to define energy metabolism of the cell. The transgenic mouse models here described make possible to study the effect of the inhibition of mitochondrial ATP synthesis in different tissues, hence helping to model different mitochondrial pathologies related to OXPHOS defects. Moreover, the results of this work provide new evidences of the participation of the H⁺-ATP synthase in cancer.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos presentes en la mayoría de las células eucariotas esenciales para su fisiología ya que, entre otras funciones, producen la mayor parte de la energía metabólica que necesita la célula (Mitchell, 1961).

Las características morfológicas de estos orgánulos están estrechamente relacionadas con la funcionalidad mitocondrial, por lo que distintos tejidos con distintos requerimientos (energéticos, metabólicos...), disponen de mitocondrias con una mayor o menor cantidad de crestas, mayor o menor elongación, en una determinada disposición o con un perfil proteómico específico (Garesse y cols., 2001; Mootha y cols., 2003a; Benard y cols., 2007; Pagliarini y cols., 2008)¹.

1.1.1. Morfología mitocondrial

Las mitocondrias se localizan en el citosol en zonas con mayor requerimiento energético donde se necesita de su capacidad metabólica, para lo cual interaccionan con otros componentes celulares (Hayashi y cols., 2009) como el retículo endoplásmico (Rizzuto y cols., 2009; Rowland y cols., 2012) o el citoesqueleto (Hollenbeck y cols., 2005; Glater y cols., 2006).

Al igual que su ancestro bacteriano (Sagan, 1967; Lane y cols., 2010), estos orgánulos se componen de dos membranas, una externa y otra interna que definen dos compartimentos: el espacio intermembrana y la matriz mitocondrial (Figura 1A).

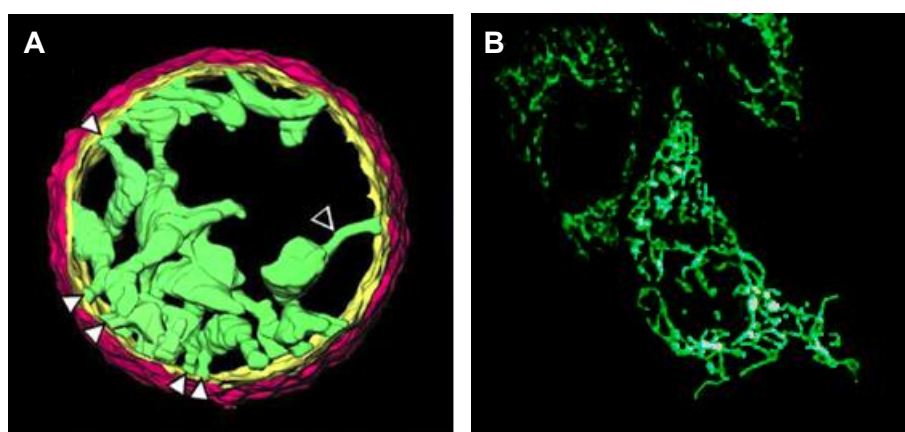


Figura 1: Estructura interna y ultraestructura mitocondrial. A: Reconstrucción 3D a partir de tomografía electrónica de una mitocondria aislada de hígado de rata. Las puntas de flecha señalan las *cristae junction*. En rosa, la membrana externa. En amarillo, la membrana interna periférica. En verde, las crestas mitocondriales. (Extraído de Mannella y cols., 2006). B: Visualización de la red mitocondrial de una célula de hepatocarcinoma humano (Hep G2) por microscopia de fluorescencia. Las mitocondrias se marcaron transfectando las células con pre β -GFP.

¹Las características morfológicas y funcionales que se describen a continuación se refieren a organismos eucariotas, concretamente mamíferos.

La membrana interna se compone, a su vez, de dos subcompartimentos: las crestas mitocondriales, formada por invaginaciones de la membrana interna, y la superficie periférica de la membrana, adyacente a la membrana externa, ambos unidos por pequeñas estructuras tubulares (*cristae junction*) (Mannella, 2000; Perkins y cols., 2000) (Figura 1A). La regulación de la formación de crestas está lejos de ser completamente comprendida y en ella podrían intervenir el contenido en fosfolípidos específicos mitocondriales (fosfatidiletanolamina y cardiolipina) (Osman y cols., 2011), las proteínas que forman supercomplejos con ellos y entre sí (Wittig y cols., 2008), el complejo mitofilina/Fcj1 o MINOS (Herrmann, 2011), la proteína OPA1 (Frezza y cols., 2006) y la ATP sintasa. Así, se han descrito dímeros de ATP sintasa que tienden a agruparse formando oligómeros dispuestos en bandas (*ribbons*) favoreciendo la curvatura de la membrana interna mitocondrial y contribuyendo a definir la estructura de las crestas mitocondriales (Allen y cols., 1989; Paumard y cols., 2002; Dudkina y cols., 2006; Strauss y cols., 2008; Davies y cols., 2012a; Davies y cols., 2012b).

La estructura interna mitocondrial descrita permite una compartimentación para llevar a cabo procesos metabólicos específicos de manera eficiente: respiración y producción de ATP en las crestas, vías del metabolismo intermediario en la matriz, transporte de proteínas en la membrana interna periférica etc. (Alberts, 2002; Gilkerson y cols., 2003). Además, permite una regulación del flujo de moléculas y aumenta la capacidad respiratoria debido a la elevada superficie de membrana interna (Davies y cols., 2011). La estructura interna de las mitocondrias es, además, dinámica: las crestas mitocondriales se comportan como cisternas polimórficas con plasticidad para fusionarse o fisionarse (Mannella, 2000) según distintos escenarios celulares como el estado metabólico (Hackenbrock, 1966; Mannella, 2006; Liesa y cols., 2013), la estimulación apoptótica (Scorrano y cols., 2002; Frezza y cols., 2006; Santamaria y cols., 2006) o la división celular (Martínez-Díez y cols., 2006).

Las mitocondrias se encuentran formando una red mitocondrial (Figura 1B) dinámica sujeta a procesos de fisión (mediada por las proteínas Drp1/Dnm1 y FIS1) y fusión (mediada por las proteínas mitofusina, MNF1/MNF2 y OPA1/Mgm1) constantes [revisado en (Westermann, 2010)] que determinan su funcionalidad y la respuesta celular a autofagia, supervivencia, o apoptosis (Martínez-Díez y cols., 2006; Santamaria y cols., 2006; Benard y cols., 2007; Tondera y cols., 2009; Gomes y cols., 2011; Martinou y cols., 2011; Rambold y cols., 2011; Liesa y cols., 2013).

1.1.2. Las mitocondrias como productores energéticos

El ATP se sintetiza en la mitocondria a partir de ADP y fosfato inorgánico (P_i) de forma acoplada a la reducción de O_2 por la cadena transportadora de electrones (CTE, Figura 2). Este proceso, denominado fosforilación oxidativa, es llevado a cabo por la H^+ -ATP sintasa (complejo V) y representa la última etapa del catabolismo oxidativo de carbohidratos, lípidos y aminoácidos. El NADH y el $FADH_2$ de la matriz, generados principalmente en el ciclo de Krebs, actúan como donadores de electrones sobre los complejos I y II de la CTE respectivamente (Figura 2). Estos complejos sufren

procesos continuos de oxidoreducción, transmitiendo los electrones a la ubiquinona o coenzima Q, que a su vez transmite los electrones al complejo III (Figura 2). Los electrones pasan al complejo IV mediados por el citocromo c (Figura 2). Por último, los electrones son cedidos al O_2 , reduciéndolo para formar H_2O . La transferencia electrónica en los complejos I, III y IV promueve el bombeo de protones al espacio intermembrana, creando un gradiente electroquímico a ambos lados de la membrana interna ($\Delta\Psi_m$). El complejo V o ATP sintasa utiliza la fuerza protón-motriz así generada para sintetizar ATP (Mitchell y cols., 1967) (Figura 2). Inherente a esta transferencia electrónica es el desvío prematuro, en mayor o menor grado, de electrones desde los complejos I y III al oxígeno, generándose anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que se transforma en peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ambas especies reactivas de oxígeno (ROS, ver sección 1.4 en Anexo I y Figura 2).

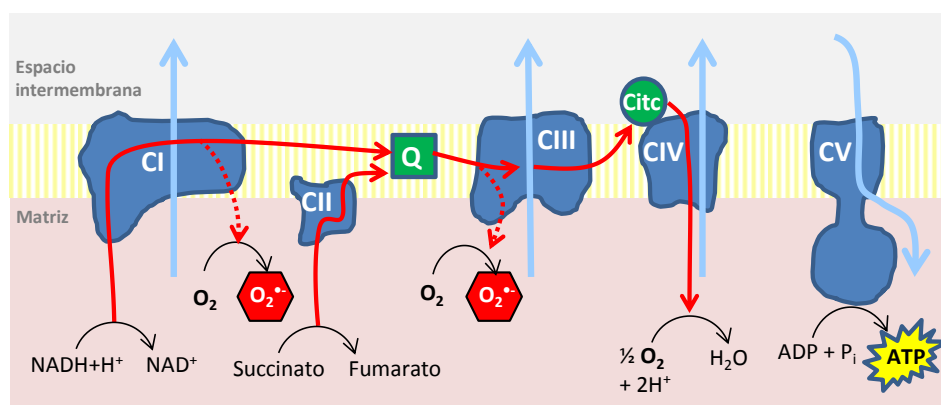


Figura 2: Cadena transportadora de electrones y fosforilación oxidativa mitocondrial. Esquema de la cadena transportadora de electrones (CTE, CI-CIV) y fosforilación oxidativa (OXPHOS, CV) en mitocondrias. Las flechas rojas continuas señalan el recorrido de los electrones a lo largo de la CTE. En línea discontinua, el desvío de electrones fuera de la CTE para generar anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) una especie reactiva de oxígeno (ROS). Las flechas azules representan el movimiento de protones (H^+). CI: complejo I o NADH deshidrogenasa; CII: complejo II o succinato deshidrogenasa; CIII: complejo III o complejo citocromo bc_1 ; CIV: complejo IV o citocromo c oxidasa; CV: complejo V o H^+ -ATP sintasa; Q: Ubiquinona o coenzima Q; Citc: citocromo c.

En contraposición a este modelo “fluido” se ha propuesto un modelo “sólido” en el que los complejos se ensamblan en supercomplejos o respirasomas (Schagger y cols., 2000; Lenaz y cols., 2007; Moreno-Lastres y cols., 2012) } gracias a proteínas (Dienhart y cols., 2008; Chen y cols., 2012) o lípidos (Pfeiffer y cols., 2003) de ensamblaje. Se cree que estos supercomplejos minimizan la generación de ROS al hacer más eficiente la transferencia electrónica al mismo tiempo que estabilizan los propios complejos (Schagger y cols., 2000; Boekema y cols., 2007). Se han identificado supercomplejos en mitocondrias de mamífero que contienen los complejos I+III, III+IV o I+II+III+IV (Schagger y cols., 2000; Acin-Perez y cols., 2008; Dudkina y cols., 2011), éste último con citocromo c y ubiquinona asociados y capacidad respiratoria (Acin-Perez y cols., 2008). La coexistencia de supercomplejos I+III de dudosa funcionalidad y de complejos II, III o IV libres junto con los supercomplejos anteriores ha llevado a la sugerencia de un modelo “plástico” (Acin-Perez y cols., 2008; Acin-Perez y cols., 2013) en el que tanto el modelo “fluido” como el “sólido” coexisten y en el que la formación de distintas combinaciones de supercomplejos puede responder a las distintas necesidades funcionales y estructurales de la célula (Schagger y cols., 2000; Cogliati y cols., 2013;

Lapiente-Brun y cols., 2013). Otros han sugerido que estos supercomplejos son, en realidad parte de estructuras oligoméricas más complejas o megacomplejos (Wittig y cols., 2006; Bultema y cols., 2009; Strecker y cols., 2010), aunque esta última posibilidad requiere más evidencias experimentales. La participación del complejo V en supercomplejos respiratorios es, sin embargo, dudosa más allá de la formación de dímeros (ver sección 1.2.1) y oligómeros entre sí o de la asociación con transportadores de nucleótidos y P_i en un ATP sintasoma (Chen y cols., 2004a; Acin-Perez y cols., 2008; Wittig y cols., 2009).

Además de esta función energética, las mitocondrias participan en otros procesos importantes de la célula, como el metabolismo celular, la biosíntesis de centros Fe/s, la señalización por Ca^{2+} y por ROS y la muerte celular (ver sección 1 en Anexo I).

1.1.3. Mitocondria y cáncer

La etiología y biología de los tumores es extremadamente compleja tanto en la clínica como en el laboratorio y, por el momento, no del todo entendida. Sin embargo, Hanahan y Weinberg en el año 2000 consiguieron racionalizar la complejidad de esta enfermedad definiendo seis características comunes y necesarias para que una célula normal se convierta en tumoral (Hanahan y cols., 2000) (Figura 3). En la última década, la activa investigación en el campo del metabolismo y el cáncer han llevado a estos autores a incluir en la secuela de su revisión (Hanahan y cols., 2011) la reprogramación del metabolismo energético, o efecto Warburg, como otra característica esencial del proceso tumoral (Figura 3).

Esta reprogramación metabólica consiste en un cambio en el fenotipo energético de la célula hacia un perfil glucolítico, incluso en presencia de oxígeno. Otto Warburg fue el primero en observar que las células tumorales tienen un metabolismo energético preferentemente glucolítico incluso en presencia de oxígeno y acuñó el término de glucólisis aeróbica (Warburg, 1956b).



Figura 3: Características fenotípicas de la célula tumoral. El esquema representa las capacidades funcionales adquiridas durante el desarrollo tumorigénico en la gran mayoría de los cánceres humanos. Recientemente, la reprogramación metabólica, junto con la evasión al sistema inmune, la inestabilidad genómica y la inflamación (en rojo), han sido incorporados a la lista inicial (Hanahan y Weinberg, 2000) de condiciones necesarias para que se produzca la transformación celular. (Modificado de Hanahan y Weinberg 2011).

Medio siglo más tarde, muchos estudios han demostrado este fenómeno en distintos tumores [revisado en (Cuezva y cols., 2009; Ortega y cols., 2009)] e incluso ha servido para desarrollar una nueva técnica de diagnóstico y pronóstico: la tomografía de emisión de positrones (PET) basada en el elevado consumo de glucosa de los tumores (Rigo y cols., 1996; Lopez-Rios y cols., 2007; Plathow y cols., 2008).

Puesto que la activación glucolítica sucede con independencia de la presencia de oxígeno, desafiando el efecto Pasteur, Otto Warburg sugirió que la glucólisis aeróbica experimentada por las células cancerígenas era debida a una reducida actividad bioenergética mitocondrial (Warburg, 1956a). La implicación de la mitocondria en el proceso de reprogramación metabólica es todavía discutida (Zu y cols., 2004; Funes y cols., 2007), aunque existen numerosos estudios transcrip-tómicos, proteómicos, estructurales y funcionales en carcinomas humanos que indican que una glucólisis activada junto a una actividad bioenergética mitocondrial reprimida son necesarias para la progresión tumoral [revisado en (Cuezva y cols., 2009; Sanchez-Arago y cols., 2013b)].

La glucólisis, es una vía ventajosa para la célula tumoral, ya que, junto a la reorganización del ciclo de Krebs, proporciona precursores biosintéticos necesarios para una elevada proliferación y es, de hecho, la vía energética de elección en células proliferativas normales (Wang y cols., 1976; Hume y cols., 1978; Brand y cols., 1997; Sanchez-Arago y cols., 2013c) y en tejidos embrionarios (Cuezva y cols., 1997; Johnson y cols., 2003; Cuezva y cols., 2007; Kondoh y cols., 2007). Además, la extrusión de lactato (Figura A1 Anexo I) y la consiguiente acidificación del medio confiere ventajas invasivas a la célula (Fukumura y cols., 2001; Gatenby y cols., 2004; Gillies y cols., 2007). Por otra parte, una afectación mitocondrial, conlleva también varias ventajas para la célula tumoral. Por un lado, una actividad mitocondrial disminuida es ventajosa en células en continua replicación porque limita el daño oxidativo en el DNA cuando más expuesto y vulnerable está (Brand y cols., 1997; Chen y cols., 2007). Además, un ciclo de Krebs truncado entre el citrato y el α -cetoglutarato junto con una activa glutaminólisis como se observa en células tumorales (Parlo y cols., 1984; Baggetto, 1992; DeBerardinis y cols., 2007) favorece la acumulación de precursores y la generación de poder reductor para biosíntesis (Hatzivassiliou y cols., 2005; DeBerardinis y cols., 2007). Por otro lado, la reducción de la dependencia de oxígeno confiere también ventajas invasivas a medida que aumenta la hipoxia en regiones del tumor (Gatenby y cols., 2003; Ramanathan y cols., 2005; van Waveren y cols., 2006; Funes y cols., 2007; de Groof y cols., 2009). Además, una respiración defectuosa promueve la generación de ROS, que puede producir mutaciones (Brandon y cols., 2006) y/o favorecer la progresión (Petros y cols., 2005; Zhou y cols., 2007), invasión (Amuthan y cols., 2001; van Waveren y cols., 2006) y metástasis (Ishikawa y cols., 2008) del tumor. Además, por el papel que juega la mitocondria en la apoptosis (ver apartado 1.5 en Anexo I), la disfunción mitocondrial permite evadir este tipo de muerte. Así, células cancerígenas con una OXPHOS relativamente activa pueden poner en marcha la apoptosis a través de una señalización de ROS en respuesta a quimioterapia (Jaattela, 2004; Santamaria y cols., 2006), pero células esencialmente glucolíticas son resistentes a la misma terapia (Shin y cols., 2005; Hernlund y cols., 2009; Shin y cols., 2009; Li y cols., 2010a; Sanchez-Arago y cols., 2013a). Por tanto, las mitocondrias se comportan como re-

presores tumorales impactando en al menos dos de las características fenotípicas de los tumores: la proliferación y la evasión a muerte. En resumen, la represión mitocondrial participa, junto con el aumento en la glucólisis aeróbica, en la reprogramación metabólica que acontece en el cáncer y que es una de las características comunes que definen esta enfermedad.

Nuestro laboratorio ha diseñado una sencilla aproximación proteómica para estudiar el efecto Warburg en tumores: el índice bioenergético celular (índice BEC) que estima el potencial mitocondrial de la célula expresado como la razón β F1ATPasa/Hsp60/GAPDH (Cuezva y cols., 2002). La mayoría (>97%) de los tumores humanos más prevalentes presentan un índice BEC disminuido, es decir, una disminución de la β F1-ATPasa y un incremento en marcadores glucolíticos (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004), característica a la que se le ha dado el nombre de *huella bioenergética del cáncer* (Cuezva y cols., 2002). Esta observación ha sido confirmada y extendida por otros laboratorios (Unwin y cols., 2003; Chen y cols., 2004b; He y cols., 2004; Bi y cols., 2006; Lin y cols., 2008; Li y cols., 2010b) y ha demostrado que tumores de diferentes tejidos o tipos histológicos tienen la misma huella bioenergética (Acebo y cols., 2009). Por otro lado, la huella bioenergética ha demostrado ser un marcador pronóstico en carcinoma de pulmón (Cuezva y cols., 2004; Lopez-Rios y cols., 2007), colon (Cuezva y cols., 2002; Lin y cols., 2008) y mama (Isidoro y cols., 2005) y un marcador predictivo de la respuesta a quimioterapia (Lin y cols., 2008; Hernlund y cols., 2009; Sanchez-Arago y cols., 2011).

Existen varios modelos que prueban que la represión mitocondrial es un fenómeno patogénico en el proceso tumoral. Los ratones KO para frataxina, proteína necesaria para la síntesis de los complejos respiratorios I, II y III (Santos y cols., 2010), tienen una reducida longevidad y desarrollan múltiples tumores hepáticos al mismo tiempo que se observa estrés oxidativo, defectos respiratorios y disminución de la síntesis de ATP en el hígado (Thierbach y cols., 2005). Además, la sobre-expresión de frataxina en líneas celulares de colon produce un aumento del metabolismo oxidativo que se acompaña de una disminución de la tasa de crecimiento celular y de la tumorigenicidad en ratones *nude* (Schulz y cols., 2006), apoyando la teoría de Warburg. Las líneas celulares no invasivas C2C12 y A549 se vuelven altamente invasivas *in vitro* (Amuthan y cols., 2001; Amuthan y cols., 2002) e *in vivo* (Amuthan y cols., 2001) cuando son sometidas a un estrés mitocondrial genético (depleción total o parcial de mtDNA) o metabólico (tratamiento con el desacoplante CCCP) mediado por la sobre-expresión de catepsina L y TGF β , importantes marcadores de invasividad tumoral (Amuthan y cols., 2001). Nuestro laboratorio ha generado otro modelo de represión de la OXPHOS por tratamiento con oligomicina. El tratamiento de células HCT 116 con este inhibidor de la ATP sintasa durante 48 horas disminuye reversiblemente la expresión de β F1ATPasa debido a una inhibición de la traducción del mRNA de β F1ATPasa (Sanchez-Arago y cols., 2010; Martinez-Reyes y cols., 2012). Como consecuencia, se produce una función OXPHOS comprometida y desestructuración mitocondrial, acompañada de un aumento en el flujo glucolítico (Sanchez-Arago y cols., 2010). Estas células OXPHOS-deficientes son más resistentes a muerte apoptótica por tratamiento *in vitro* con 5-fluoruracilo (Sanchez-Arago y cols., 2010; Sanchez-Arago y cols., 2011) y generan tumores más rápidamente cuando son inoculadas en ratones *nude* (Sanchez-Arago y cols., 2010).

Otras patologías donde las mitocondrias están implicadas y algunos modelos descritos relacionados con éstas pueden consultarse en las secciones 2 y 3 del Anexo I.

El intento de generación de ratones KO para la secuencia reguladora de la traducción del mRNA de β F1ATPasa en nuestro laboratorio resultó ser letal en desarrollo embrionario (datos no publicados). Es por ello que, para poder generar modelos murinos con deficiencia de complejo V, fue necesario diseñar una estrategia metodológica más compleja. Como se verá en esta Tesis, la sobre-expresión condicional del inhibidor de la ATPasa, IF1, permite un control tejido-temporal de la actividad ATPasa mitocondrial, pudiendo inhibir la actividad de este complejo en fases avanzadas del desarrollo y/o en tejidos específicos del animal.

1.2. LA H^+ -ATP SINTASA MITOCONDRIAL

La síntesis de ATP es la reacción enzimática más prevalente en los seres vivos, por lo que la ATP sintasa es una de las proteínas más ubicuas y abundantes en la Tierra, además de ser una de las más conservadas durante la evolución (Yoshida y cols., 2001)².

1.2.1. Estructura

La ATP sintasa mitocondrial es un complejo enzimático donde se diferencian dos dominios funcionales principales, el sector liposoluble F_o ($c_{8-10}a_1$) embebido en la membrana, y el sector hidrosoluble globular F_1 ($\alpha_3\beta_3$) orientado hacia la matriz extracelular, unidos entre sí por un brazo lateral ($b_1F_6d_1A_6L_1OSCP_1$) y un brazo central ($\delta_1\epsilon_1Y_1$) (Figura 4A) (Walker y cols., 2006; Weber, 2006; Devenish y cols., 2008; Walker, 2013). Posiblemente otras subunidades accesorias que varían según la especie [subunidades *e*, *f*, *g*, A6L, DAPIT y el proteolípido de 8kDa en la ATP sintasa mitocondrial (Walker, 2013)] interaccionan con el brazo lateral o con la subunidad a de F_o (Figura 4A) contribuyendo a la estructura, regulación y organización supramolecular de la ATPasa. Se han encontrado dímeros e incluso oligómeros de ATP sintasa en mitocondrias de varios orígenes [revisado en (Devenish y cols., 2008)] que, si bien no parecen afectar a su actividad enzimática (Arnold y cols., 1998; Boyle y cols., 1999; Paumard y cols., 2002; Wittig y cols., 2006), juegan un papel importante en la formación de crestas mitocondriales (Allen y cols., 1989; Paumard y cols., 2002; Dudkina y cols., 2006; Davies y cols., 2012b; Daum y cols., 2013).

² Además de su localización mitocondrial, algunos estudios sugieren la existencia de una H^+ -ATPasa y de su regulador IF1 en la membrana plasmática [(Burwick y cols., 2005; Contessi y cols., 2007; Giorgio y cols., 2010; Ravera y cols., 2011) y revisado en (Devenish y cols., 2008)], especialmente en hepatocitos, donde actuaría como un receptor HDL para la apolipoproteína A-I (Martínez y cols., 2003). Sin embargo, su existencia plantea serias dudas ya que por el momento no se ha aislado la proteína completa en esta localización y tampoco se dispone de una explicación clara de cómo las proteínas codificadas en el mtDNA pueden ser exportadas hasta la membrana plasmática (Devenish y cols., 2008). Resultados de inmunolocalización y fraccionamiento subcelular con diferentes anticuerpos anti- β F1ATPasa en células hepáticas no apoyan la existencia de esta ATPasa ectópica (Willers y cols., 2012). Por todo ello, en este estudio nos referimos exclusivamente a la H^+ -ATPasa mitocondrial.

1.2.2. Mecanismo de acción.

La ATP sintasa tiene un excepcional mecanismo de catálisis producido por una rotación física de sus subunidades, actuando como un verdadero motor molecular en el que el anillo de subunidades c y el brazo central actúan como rotor y la subunidad a , el brazo lateral y el hexámero globular $\alpha_3\beta_3$ como estator. Los protones entran en la matriz mitocondrial por un canal en F_o entre la subunidad a y el anillo de subunidades c . Esta entrada a favor de gradiente (generado por la CTE) libera energía que hace girar el anillo de subunidades c (F_o), y las unidades δ , ϵ y γ (brazo central, F_1) a las que está unido. El hexámero $\alpha_3\beta_3$ (F_1) permanece fijo gracias al brazo lateral que lo conecta con la F_o y es la rotación de la subunidad γ en el interior del hexámero la que proporciona la energía necesaria para sintetizar ATP en los sitios catalíticos de las subunidades β (Weber y cols., 2003). Esto es posible porque el extremo carboxilo de la subunidad γ está doblado sobre sí mismo creando una asimetría en el interior del hexámero que hace que los contactos con las subunidades catalíticas varíen durante la rotación y, por tanto, varíe la afinidad de los sitios catalíticos por los nucleótidos en un mecanismo enzimático complejo que se conoce como catálisis rotatoria (Boyer, 1997; Stock y cols., 1999; Weber y cols., 2003; Walker y cols., 2006; Adachi y cols., 2007; Walker, 2013).

La primera teoría que explicó la catálisis rotatoria fue el mecanismo de “unión-cambio” propuesto por P. Boyer en 1975 (Boyer, 1975). En ella, los tres sitios catalíticos pasaban por tres estados conformacionales diferentes con distinta afinidad por nucleótidos. Posteriormente se demostró que los cambios de conformación de un estado a otro eran debidos a la rotación de la subunidad γ . En el modelo de P. Boyer, sin embargo, sólo dos de los tres sitios catalíticos estarían ocupados simultáneamente con nucleótidos en lo que sería un catálisis “bi-site”. Según los últimos estudios (Weber, 2006; Adachi y cols., 2007; Mao y cols., 2007) la catálisis rotatoria es “tri-site”, es decir, es necesario que los tres sitios catalíticos estén la mayor parte del tiempo ocupados para alcanzar V_{max} , y es altamente cooperativa, lo que permite la elevada eficiencia de catálisis que caracteriza a esta enzima. La subunidad γ no rota los 360° de forma uniforme como lo hace el anillo de subunidades c sino en tres pasos de 120° , posiblemente divididos en subrotaciones de 80-90° (de B a C en Figura 4B) y 30-40° (de D a A en Figura 4B) (Mao y cols., 2007; Walker, 2013) separados entre sí por una pequeña pausa (estado D en Figura 4B, paso limitante de la reacción) (Adachi y cols., 2007; Mao y cols., 2007; Walker, 2013). Esta discontinuidad en la rotación de la subunidad γ es almacenada transitoriamente y liberada bruscamente para producir los cambios conformacionales en la interfase α/β , aunque se desconoce cuál es el elemento elástico responsable del almacenamiento transitorio de esta energía.

La H^+ -ATP sintasa sintetiza así ATP (Figura 4C arriba), pero esta enzima tiene la capacidad de funcionar en modo reverso, hidrolizando ATP y translocando H^+ al espacio intermembrana en determinadas circunstancias (Figura 4C abajo).

La cristalografía por rayos X de alta resolución ha permitido desentrañar el mecanismo de la hidrólisis de ATPasa. Al parecer, esta ocurre simultáneamente en los tres sitios catalíticos, hidroliz-

zándose 3 moléculas de ATP en cada ciclo. Cada subunidad β pasa por tres estados conformacionales durante un ciclo β_E , β_{TP} y β_{DP} . Un estudio ha identificado un cuarto estado de subunidad β , β_{HC} que corresponde a un estado avanzado de β_E parcialmente cerrado (Mao y cols., 2007). Estas diferentes conformaciones contienen sitios catalíticos abiertos (O) en β_E y sitios catalíticos de baja (L), media (M) y alta (H) afinidad por nucleótidos en β_{HC} , β_{DP} y β_{TP} respectivamente (Figura 4C).

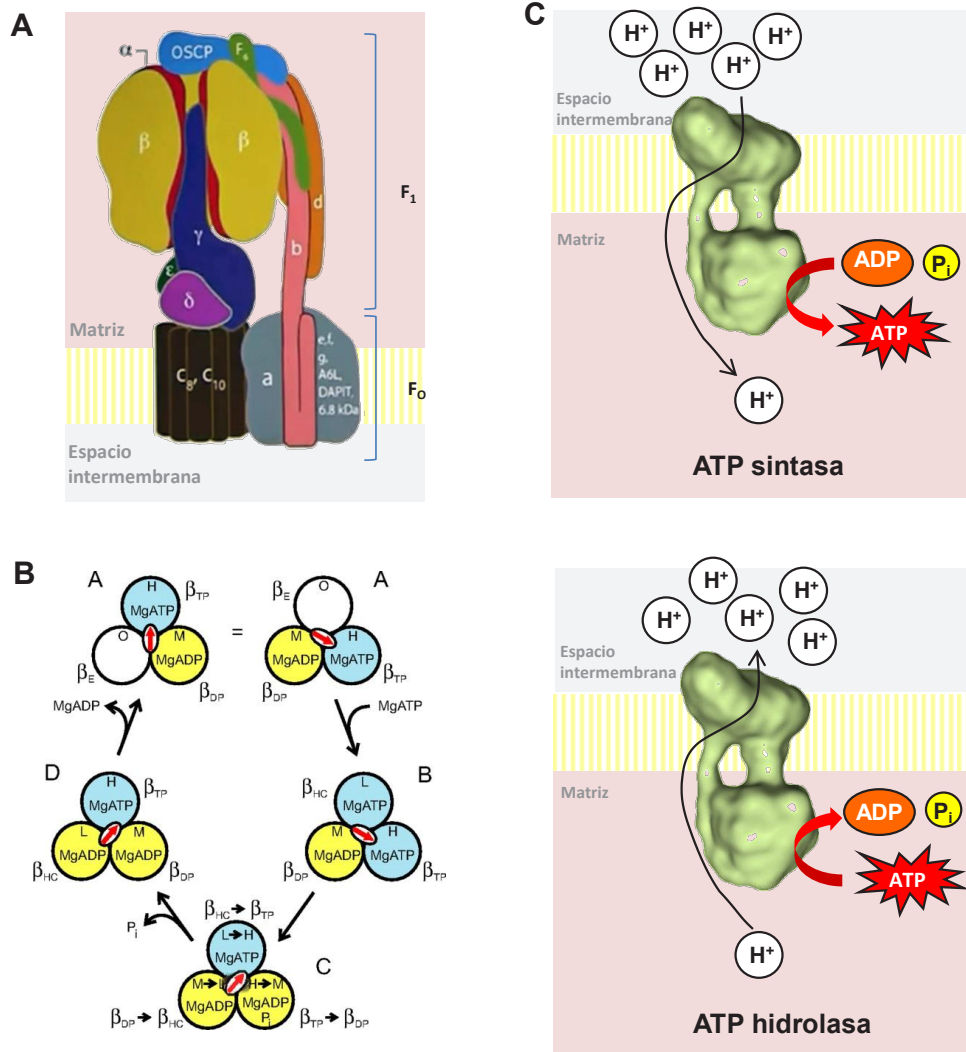


Figura 4: Estructura y funcionamiento de la H^+ -ATP sintasa mitocondrial. **A:** Representación esquemática de la organización de subunidades en la ATP sintasa mitocondrial. F_1 es el dominio globular (representado sin una subunidad α para mayor claridad) formado por las subunidades $\alpha_3\beta_3$ y las subunidades γ , δ y ϵ del brazo central. F_0 es el dominio liposoluble formado por el oligómero de subunidades c (10 copias en el caso de levaduras), a y otras subunidades menores e , f , g y A6L en la membrana y las subunidades b , F_6 , d y OSCP que forman el brazo periférico (Modificado de Walker, 2013). **B:** Mecanismo de hidrólisis de ATP por la ATP sintasa (vista desde la membrana) durante una rotación de 120° de la subunidad γ . Tras la liberación de ADP del ciclo anterior, se une ATP a un sitio O (de A a B) y, por cooperatividad, se produce la hidrólisis en un sitio catalítico H (de B a C). La hidrólisis de ATP induce una rotación de 80° con un consecuente cambio conformacional en los sitios catalíticos. La liberación de P_i (de C a D) produce una rotación de 40° seguida de la liberación de ADP (de D a A) para regenerar el ciclo. La fecha central roja indica la rotación de la subunidad γ . O: sitio catalítico abierto (open). H: sitio catalítico de alta (high) afinidad. M: sitio catalítico de media (medium) afinidad. L: sitio catalítico de baja (low) afinidad. β_E : subunidad β en conformación abierta. β_{HC} : subunidad β en conformación parcialmente cerrada. β_{DP} : subunidad β con ADP unido. β_{TP} : subunidad β con ATP unido (extraído de Mao y Weber 2007). **C:** Esquema del funcionamiento directo (ATP sintasa, panel superior) y reverso (ATP hidrolasa, panel inferior) de la ATPasa mitocondrial (en verde, modificada de Baker y cols., 2012). En la función reversa, la ATPasa mitocondrial extruye protones (H^+) al espacio intermembrana, utilizando para ello la energía de la hidrólisis de ATP.

El ciclo catalítico ocurre, en el sentido de hidrólisis, como se describe en la Figura 4C. La rotación de la enzima ha sido demostrada también en el sentido de síntesis de ATP (Itoh y cols., 2004; Rondelez y cols., 2005) y, aunque no corroborado todavía por la complejidad experimental que supone, se cree que el mecanismo catalítico rotatorio es básicamente el mismo pero en reverso (Adachi y cols., 2007).

1.2.3.Regulación

La síntesis de ATP debe estar finamente regulada para adaptarse a las amplias fluctuaciones en las necesidades energéticas de la célula por ejemplo, entre un estado de actividad física o de reposo en una célula muscular. A pesar del importante papel de la H⁺-ATP sintasa en la producción de ATP, la regulación de su expresión y actividad no ha sido muy estudiada.

Esta regulación puede darse a nivel de la expresión proteica, especialmente de su subunidad catalítica. En este sentido, se ha descrito que la hipermetilación del gen que codifica para la β F1ATPasa (ATP5B) limita la expresión de la proteína en células de leucemia mieloide crónica (Li y cols., 2010a). A nivel traduccional, la proteína G3BP y miR-127-5p interaccionan con el 3'-UTR de β -mRNA reprimiendo su traducción, mecanismo de especial relevancia en cáncer (Ortega y cols., 2010) y durante el desarrollo (Willers y cols., 2012) respectivamente.

La regulación de la ATP sintasa puede ejercerse también sobre su actividad, por ejemplo, a través de la concentración de sustratos o productos (ADP/ATP, P_i, $\Delta\Psi_m$) (Nelson y cols., 2007). Además, la H⁺-ATP sintasa cuenta con una proteína reguladora específica, IF1 que inhibe su actividad. Se conocen otras proteínas que interaccionan directamente con la H⁺-ATP sintasa, aunque su función no está del todo caracterizada: el llamado factor B parece estar implicado en la oligomerización de la H⁺-ATP sintasa, favoreciendo la síntesis de ATP (Belogrudov, 2009); CaBI podría regular la enzima en respuesta a incrementos en el Ca²⁺ citosólico (Yamada y cols., 1989) y S100A1 podría actuar aumentando el rendimiento del enzima en músculo cardíaco (Boerries y cols., 2007).

1.3. EL INHIBIDOR FISIOLÓGICO DE LA ATP SINTASA: IF1

La proteína IF1 o *Inhibitory Factor 1* fue descrita por primera vez en los años 60 por Pullman y Monroy como un pequeño inhibidor peptídico termoestable y con capacidad de inhibir la actividad hidrolítica de la F1ATPasa solubilizada (Pullman y cols., 1963). A pesar de ser un regulador de una de las enzimas más esenciales de la célula, el volumen de estudios sobre esta proteína desde entonces ha sido modesto, posiblemente por el desencanto de no encontrar un papel claro de IF1 sobre OXPHOS (Pullman y cols., 1963). Sin embargo, desde hace unos años, comienza a desvelarse la estructura y propiedades de esta proteína al mismo tiempo que se va esclareciendo su función en la fisiología y biología celular.

IF1 (*H. sapiens*) es una proteína mitocondrial (CCDS319.1) de 106 aminoácidos (~12 kDa, pI=10) codificada en el gen nuclear *ATPIF1* (Gene ID: 93974; Ensembl: ENSG00000130770) del cro-

mosoma 1. Existen al menos tres transcritos codificantes, aunque se desconocen los mecanismos que regulan la síntesis de una u otra isoforma o las diferencias en su función biológica. La variante 1 tiene 3 exones y codifica para la isoforma normalmente detectada y estudiada (CCDS319.1) de 106 aminoácidos (12,2 kDa, $pI=10$). La variante 2 contiene también tres exones pero el último es diferente y codifica para una proteína (CCDS320) de 71 aminoácidos (7,9 kDa, $pI=8,5$). La variante 3 contiene sólo los dos primeros exones más un largo 3'UTR y codifica para una proteína (CCDS44096) de 60 aminoácidos ($\approx 6,6$ kDa, $pI=9,3$). Las tres isoformas proteicas son idénticas desde los aminoácidos 1-60. El análisis de homología con otras secuencias (Figura 5A) predice una pre-secuencia de 25 aminoácidos en el extremo N-terminal aunque SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) señala un sitio de corte en la posición 16. Esta pre-secuencia probablemente es la que señala la proteína a mitocondria (Walker y cols., 1987) aunque el mecanismo exacto de su importe es desconocido así como su implicación en la regulación de la actividad del inhibidor. Obviando la pre-secuencia, las isoformas maduras de IF1 tienen, por tanto, un peso de 9,5-10,6 kDa; 5,2-6,3 kDa y 3,9-5,0 kDa ($pI=7,2-9,7$; 5,0-7,4 y 4,6-6,8) según una u otra predicción.

IF1 (*M. musculus*) tiene también 106 aminoácidos (CCDS18727) y propiedades semejantes (12,2 kDa; $pI=10,37$). Está codificada por el gen *Atpif1* (Ensembl: ENSMUSG00000054428.6) en el cromosoma 4. Puede que haya otra variante de *splicing* codificante pero su anotación no está completamente confirmada. SignalP no predice un sitio de corte, pero por homología con otras secuencias se puede predecir también una pre-secuencia de 25 aminoácidos en el extremo N-terminal. La proteína madura tiene un peso de 9,5 kDa ($pI=9,1$).

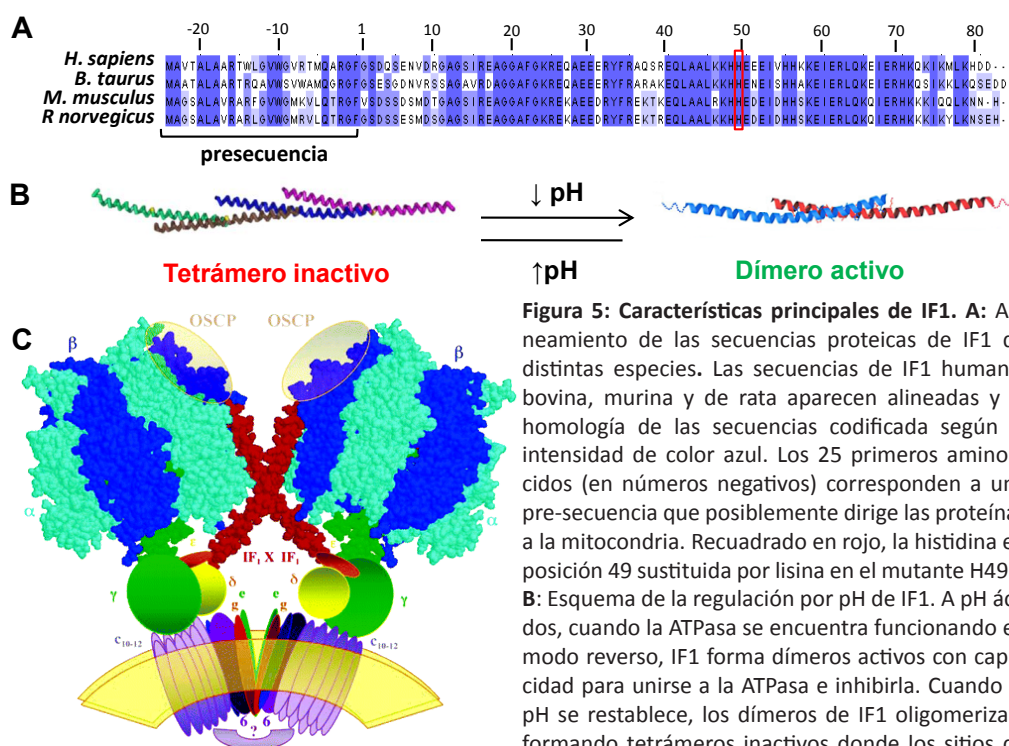


Figura 5: Características principales de IF1. A: Alineamiento de las secuencias proteicas de IF1 de distintas especies. Las secuencias de IF1 humana, bovina, murina y de rata aparecen alineadas y la homología de las secuencias codificada según la intensidad de color azul. Los 25 primeros aminoácidos (en números negativos) corresponden a una pre-secuencia que posiblemente dirige las proteínas a la mitocondria. Recuadrado en rojo, la histidina en posición 49 sustituida por lisina en el mutante H49K. B: Esquema de la regulación por pH de IF1. A pH ácido, cuando la ATPasa se encuentra funcionando en modo reverso, IF1 forma dímeros activos con capacidad para unirse a la ATPasa e inhibirla. Cuando el pH se restablece, los dímeros de IF1 oligomerizan, formando tetrámeros inactivos donde los sitios de

unión quedan ocultos y por tanto, incapaces de unirse a la ATPasa (Modificado de Cabezon y cols., 2001). C: Modelo propuesto por J. García en el que se muestra como el dímero de IF1 interacciona con una molécula de F1ATPasa por su extremo N-terminal y con la subunidad OSCP de otra molécula de ATPasa por su extremo C-terminal, contribuyendo a la dimerización de dos ATPasa (extraído de García y cols., 2006).

1.3.1. Homología

IF1 ha sido descrito en mitocondrias de mamíferos (Pullman y cols., 1963; Cintron y cols., 1979; Rouslin, 1987), aves (Rouslin, 1987), anfibios (Rouslin y cols., 1995), tripanosomas (Rilo y cols., 1989), *Caenorhabditis elegans* (Ichikawa y cols., 2006), levaduras (Hashimoto y cols., 1981; Dianoux, 1986) y plantas (Norling y cols., 1990). La homología de secuencias peptídicas de IF1 entre distintas especies (Figura 5A) es significativa (Tabla 1), especialmente en las regiones esenciales para su actividad (ver sección 1.3.4.1), por lo que la IF1 de una especie es capaz de inhibir la β F1ATPasa de otra (Cintron y cols., 1979; Dianoux y cols., 1987; Rouslin y cols., 1993; Cabezon y cols., 2002). La región más conservada de IF1 es aquella que interacciona con la β F1ATPasa (aminoácidos 20-50) donde la homología de IF1 humano y bovino es del 90%, por ejemplo (Green y cols., 2000). No existen homólogos a IF1 en bacterias o cloroplastos, y de hecho IF1 bovino o de levadura no inhiben la ATPasa de *E. coli* (Pullman y cols., 1963; Gledhill y cols., 2005). El homólogo a IF1 en levaduras (Inh1) y en mitocondrias de plantas (latp) tiene propiedades estructurales y mecánicas diferentes (la proteína de levadura actúa junto a dos proteínas accesorias, Stf1 y Stf2) (Hashimoto y cols., 1984; Hashimoto y cols., 1990; Venard y cols., 2003) y su homología es mucho menor que entre proteínas animales (Tabla 1) (Polgreen y cols., 1995). Sin embargo, existe reactividad cruzada entre β F1ATPasa animal e IF1 de levadura (Hashimoto y cols., 1984; Cabezon y cols., 2002), aunque no con IF1 de plantas (Polgreen y cols., 1995).

Tabla 1: Homología entre las secuencias proteicas del inhibidor de la ATPasa en distintas especies eucariotas. Se indica el nombre aceptado del inhibidor según la especie, su tamaño en número de aminoácidos (aa), su porcentaje de homología respecto a IF1 de *H. sapiens* y, si procede, su porcentaje de homología respecto a otras especies (entre paréntesis). En *S. cerevisiae*, Inh1 es considerada la proteína inhibidora y Stf1 y Stf2 proteínas accesorias.

	Nombre del inhibidor	Tamaño (aa)	% Homología con <i>H. sapiens</i>	% Homología con otras especies
<i>H. sapiens</i>	IF1	106	100	-
<i>B. taurus</i>	IF1	109	72	65 (con <i>R. norvegicus</i>)
<i>R. norvegicus</i>	IF1	107	74	89 (con <i>M. musculus</i>)
<i>M. musculus</i>	IF1	106	67	62 (con <i>R. norvegicus</i>)
<i>C. elegans</i>	Mai-2	109	32	-
<i>S. tuberosum</i>	latp	56	23	-
<i>S. cerevisiae</i>	Inh1	85	22	40 (con Stf1)
	Stf1	86	26	-
	Stf2	84	19	10 (con Inh1)

1.3.2. Regulación de IF1

Por el momento, no se ha descrito la región promotora de este gen ni los factores de transcripción ni otros elementos reguladores. La secuenciación en experimentos ChIP masivos muestra que existen varios factores de transcripción implicados en la regulación del ciclo celular (*NF-YB*, *NF-YA*, *Ini1*, *TAF1*), proliferación (*c-FOS*, *Sp1*, *c-MYC*), inflamación y muerte celular (*NFκB*), función y biogénesis mitocondrial (*NRF1*) que se unen a la región promotora del gen *ATPIF1* en esta zona (Sanchez-Arago y cols., 2013b), aunque ninguno ha sido estudiado específicamente hasta el momento.

Por su papel en la adaptación a hipoxia HIF-1 α podría ser un candidato regulador de la expresión de IF1 y de hecho, algunos autores han descrito una relación entre el factor inducible por hipoxia HIF-1 α y la transcripción del mRNA de IF1 (Huang y cols., 2011). Sin embargo, la inducción de la expresión de HIF-1 α en células de colon, ovario, pulmón y mama mediante tratamiento con CoCl₂ no indujo aumento de la expresión de IF1 (Sanchez-Arago y cols., 2013b). Por otro lado, la regulación de IF1 parece ejercerse a nivel post-transcripcional ya que el tratamiento de osteocitos, hMSC o células HCT116 con AEBSEF, un inhibidor de serín-proteasas, aumenta significativamente la cantidad de IF1 celular (Sanchez-Arago y cols., 2013b; Sanchez-Arago y cols., 2013c). El tiempo de vida de IF1 es corto, aproximadamente 100 min (Sanchez-Arago y cols., 2013b). Se ha descrito que el gen *IER-1* murino (*IER-3* en humanos) media en la degradación de IF1 por proteasas mitocondriales (Shen y cols., 2009) impidiendo la unión de proteínas que interaccionan con IF1 (región 58-73) y que la protegen de la proteólisis (Shen y cols., 2009). Sin embargo, el silenciamiento de *IER-3* no afecta a la expresión de IF1 lo que indica que la degradación de IF1 es un proceso complejo (Sanchez-Arago y cols., 2013b).

Se ha descrito que la calmodulina (CaM) tiene capacidad de unirse a IF1, regulando así su actividad inhibitoria sobre la H⁺-ATP sintasa (Pedersen y cols., 1984; Contessi y cols., 2005; Contessi y cols., 2007; Pagnozzi y cols., 2010). Al parecer, el dominio C-terminal de la CaM interacciona de forma calcio-dependiente y a pH ácido en una estequiometría 1:1 con la región N-terminal de IF1, favoreciendo la disociación de los dímeros (Contessi y cols., 2005; Pagnozzi y cols., 2010). Puesto que la CaM se encuentra exclusivamente en el citosol se ha propuesto que el complejo IF1-CaM podría regular el importe de IF1 a la mitocondria (Contessi y cols., 2005; Contessi y cols., 2007).

1.3.3. Estructura de IF1 e interacción con β F1ATPasa

La estructura de IF1 así como su interacción con β F1ATPasa ha sido extensamente estudiada, especialmente en el sistema bovino, al que nos referiremos en esta sección salvo que se indique lo contrario.

1.3.3.1. Estructura de IF1 y análisis de su secuencia.

IF1 es una proteína básica con forma mayoritariamente de α -hélice que presenta una activación a pH bajo. Su capacidad de inhibición es óptima a pH 5,8-7 y disminuye drásticamente por encima de la neutralidad (Pullman y cols., 1963; Galante y cols., 1981; Panchenko y cols., 1985; Sah y cols., 1993; Cabezón y cols., 2000b). A pH ácido, dos moléculas de IF1 dimerizan por sus extremos C-terminal con otra molécula de IF1, dejando los sitios activos disponibles para interaccionar con la ATPasa (Figura 5B) (Cabezón y cols., 2000b; Cabezón y cols., 2001; Gordon-Smith y cols., 2001). Cuando el pH aumenta, los dímeros tienden a formar tetrameros por interacción de dos dímeros en la región N-terminal donde están los sitios activos, imposibilitando la acción inhibitoria sobre la ATPasa (Figura 5B) (Cabezón y cols., 2000b; Cabezón y cols., 2001).

No hay consenso en la actualidad sobre la región mínima inhibitoria debido a la discrepancia en los resultados de varios laboratorios, posiblemente causadas por las diferentes condiciones experimentales empleadas (fundamentalmente, concernientes al pH). Parece claro que los residuos de los extremos 1-9 y 57-84 son prescindibles en la acción inhibitoria de IF1 (Hashimoto y cols., 1995; van Raaij y cols., 1996; Harris, 1997; Andrianaivomananjaona y cols., 2011; Bason y cols., 2011) aunque recientemente se ha propuesto que los residuos 1-7 pueden ser los responsables de desestabilizar la unión con β F1ATPasa permitiendo que IF1 abandone el sitio catalítico para dejar de inhibir la enzima (Bason y cols., 2011). Los residuos 13-20 parecen estabilizar la unión de IF1 a β F1ATPasa interaccionando con la subunidad γ de la ATPasa. El laboratorio de J. Walker ha identificado los aminoácidos 14-47 de IF1 como la región mínima inhibitoria (van Raaij y cols., 1996). El grupo de S. Papa, sin embargo, propone la región 42-58 como el dominio inhibidor más potente (Papa y cols., 1996) ya que el péptido IF1-(42-58) inhibe con la misma o incluso mayor potencia que IF1 purificado o recombinante y con las mismas propiedades de estabilidad de unión y dependencia de pH (Papa y cols., 1996; Zanotti y cols., 2000; de Chiara y cols., 2002). Este péptido, afirman, es más activo y estable en su unión a FOF1ATPasa que el péptido IF1-(10-47) del laboratorio de J. Walker (Zanotti y cols., 2000). Además, afirman que los residuos 42-48 son responsables de la inhibición de la translocación de protones (Zanotti y cols., 2009). En cualquier caso, probablemente la región inhibitoria implique en mayor o menor grado a los aminoácidos 20-50 ya que es la región mejor conservada entre especies animales (Figura 5A).

Por otra parte, el análisis cristalográfico de IF1 muestra que la formación de dímeros se produce por interacción de dos monómeros en dobles-hélices antiparalelas en el extremo C-terminal de la proteína (Cabezón y cols., 2001; Gordon-Smith y cols., 2001). Esta unión está estabilizada por interacciones hidrofóbicas que implican a los residuos de histidina, leucina e isoleucina de la región 49-81 y por residuos polares complementarios que compensan cargas locales en el extremo de esta región (Cabezón y cols., 2001). IF1 interacciona con la ATPasa en forma de dímero (Cabezón y cols., 2000a; Cabezón y cols., 2003) y, de hecho, los aminoácidos 48-56 estabilizan la unión IF1-F1ATPasa por su capacidad de formar dímeros con otra molécula de IF1 (Cabezón y cols., 2003).

En cuanto a la regulación de la actividad de IF1 por pH, se ha sugerido que la estructura de IF1 varía de una conformación inactiva altamente helicoidal por encima de pH 6,7 a una forma activa menos helicoidal por debajo de pH 6,7 (Lebowitz y cols., 1993; Cabezón y cols., 2000b). El análisis aminoacídico de la secuencia de IF1 revela 5 histidinas conservadas en las posiciones 48, 49, 55, 56 y 70 con valores de pKa estimados dentro del rango de regulación por pH de la proteína, por lo que la protonación o desprotonación de estos residuos podrían ser los responsables del cambio en la estructura de IF1 y, por tanto, de su interacción con la H^+ -ATP sintasa. El reemplazo de una de las histidinas H48, H49, H55 y H56 o todas ellas en el péptido inhibitorio IF1-(42-58) resulta en una pérdida de actividad y de regulación por pH (Papa y cols., 1996; Zanotti y cols., 2000). Sin embargo, en otros estudios de mutagénesis dirigida contra la H49 en IF1 bovina (Schnitzer y cols., 1996; Cabezón y cols., 2000b) o la H48 o H55 en rata (Lebowitz y cols., 1996) se mantiene la actividad del inhibidor incluso a pH>6,7. Es decir, las histidinas parecen ser esenciales para la sensibilidad a

pH que muestra la proteína. Estudios más detallados con el mutante H49K muestran que la H49 es responsable de cambios estructurales que afectan a la capacidad de formar tetrámeros inactivos a pH básico. Estos tetrámeros se forman por interacciones en doble-hélice de dos dímeros en la región 32-43, que incluye los sitios activos inhibitorios. La mutación H49K predice una menor formación de dobles-hélices en esa zona, dificultando la formación de tetrámeros inactivos a pH 8 y dejando disponibles los sitios activos en cualquier rango de pH (Cabezón y cols., 2000b). No obstante, es posible que existan otros mecanismos que regulen la activación/inactivación por pH ya que H49 no está conservado en levaduras (Ando y cols., 2008), la regulación por pH se ha observado también en los péptidos IF1-(22-46) (Papa y cols., 1996; Cabezón y cols., 2000b) y IF1-(32-43) (Cabezón y cols., 2000), y el residuo altamente conservado E26 regula la actividad inhibitoria de IF1 dependiente de pH sin afectar a la agregación (Ando y cols., 2008).

1.3.3.2. Interacción de IF1 con β F1ATPasa

La estructura cristalográfica de IF1 en su interacción con la H^+ -ATP sintasa ha sido estudiada con detalle (Cabezón y cols., 2003; Gledhill y cols., 2007). IF1 tiene una estructura extendida en los primeros aminoácidos del extremo N-terminal que dota a la proteína de cierta flexibilidad (Cabezón y cols., 2001; Cabezón y cols., 2003) y que ayuda a la estabilización de la unión IF1-F1ATPasa. El resto de la estructura de IF1 es altamente helicoidal, con los residuos 14-18 formando una pequeña α -hélice y los residuos siguientes formando una α -hélice larga separadas ambas en un ángulo de 90° por un lazo que forman los aminoácidos 19 y 20 (Gledhill y cols., 2007). El extremo N-terminal (hasta residuo 47-50) queda dentro de la estructura de F1ATPasa, formando interacciones con varias subunidades, mientras que el extremo C-terminal quedaría fuera presumiblemente formando dímeros con otra IF1-F1ATPasa (Cabezón y cols., 2000a; Cabezón y cols., 2003). IF1 se introduce por una oquedad profunda en el dominio C-terminal de β F1ATPasa e interacciona con la interfase α/β (residuos 394-459 de β F1ATPasa), produciendo importantes modificaciones conformacionales. IF1 llega a la cavidad central, interacciona con la subunidad γ , la región 8-13 de IF1 la rodea y establece contactos con otra subunidad α/β alterando ligeramente su conformación (Cabezón y cols., 2003; Gledhill y cols., 2007). La interacción con la subunidad γ es comparativamente mucho menor que la interacción en la interfase α/β , por lo que probablemente la inhibición sea debida al bloqueo de los cambios conformacionales en α/β necesarios para la catálisis y, en menor medida, al bloqueo de la rotación de la subunidad γ (Cabezón y cols., 2003). Estudios de cross-linking sugieren que IF1 interacciona, además, con la subunidad ϵ (Minauro-Sanmiguel y cols., 2002) y, de hecho, la modificación química de la subunidad ϵ disminuye la capacidad inhibitoria de IF1 cuando el inhibidor está unido a la ATPasa (Solaini y cols., 1997). Según Papa y cols., es el fragmento central de IF1 (aminoácidos 42-58) el que interacciona con la interfase de α/β de forma pH-dependiente impidiendo la catálisis rotatoria (Zanotti y cols., 2004). Sin embargo, afirman que el dominio F_o de la ATPasa participa también en la interacción IF1-ATPasa ya que IF1 es más activo frente al complejo FOF1ATPasa que frente a F1ATPasa soluble (Guerrieri y cols., 1987; Green y cols., 2000; Papa y cols., 2000). Así, estudios de cross-linking muestran que IF1 interacciona también con la OSCP de

F₀ por su extremo C-terminal de manera independiente de pH (Papa y cols., 2000; Zanotti y cols., 2004). Según García y cols. (García y cols., 2006), la interacción de IF1 sucede a nivel de la interfase entre α/β con γ/ϵ en su extremo N-terminal y a nivel de la OSCP de otra molécula de ATPasa con la que forma un dímero (Figura 5C). La formación de dímeros de IF1 cruzados que interaccionan con dos F1ATPasas podría dar más resistencia para bloquear la rotación del motor central (García y cols., 2006) y explicaría la interacción de IF1 con OSCP (Papa y cols., 2000; Zanotti y cols., 2004). No obstante y tal y como se discute más adelante, la contribución de IF1 a la formación de dímeros es controvertida.

El mecanismo secuencial de unión de IF1 propuesto recientemente indica que en primer lugar interaccionan los residuos E30, Y33, F34, L42, Q41 y L45 de IF1 situados en la hélice α larga con el extremo C-terminal de β F1ATPasa en su estado abierto, β_E . Los residuos A21, R25, Q27, R37, K39, E40, A43, y A44 participan también estabilizando la interacción. El giro de 120° cierra la interfase α_E/β_E que pasa a ser α_{TP}/β_{TP} , con la que interacciona, además A38. Otra rotación de 120° de la subunidad γ lleva al estado final inhibitorio, en el que la interfase pasa a ser α_{DP}/β_{DP} y en la que el residuo F22 interacciona finalmente con β_{TP} y la región terminal interacciona con γ y con α_E (Bason y cols., 2011).

1.3.3.3. IF1 y dimerización de β F1ATPasa

Aunque la estequiometría de la interacción de IF1:ATPasa no está del todo confirmada (García y cols., 2006), parece que 1 mol de IF1 interacciona con 1 mol de ATPasa (Klein y cols., 1980; Hashimoto y cols., 1981; Klein y cols., 1981; Hekman y cols., 1991). Por la capacidad de dimerización de IF1, es probable que un dímero de IF1 interaccione con 2 moléculas de ATPasa en una estequiometría 2:2 (Cabezon y cols., 2000a; García y cols., 2006) contribuyendo a la formación de dímeros de ATPasa, aunque este aspecto es controvertido.

Se ha encontrado IF1 bovino formando dímeros de F1ATPasa por cristalografía, cromatografía, ultracentrifugación y microscopía electrónica (Cabezon y cols., 2000a; Dominguez-Ramirez y cols., 2001; Cabezon y cols., 2003; Campanella y cols., 2008). Otros estudios muestran un enriquecimiento en dímeros cuanto mayor es la cantidad de IF1 presente en hígado o corazón de rata (García y cols., 2006). En mitocondrias de sincitiotrofbastos (placenta humana) se ha observado una correlación entre su bajo contenido en dímeros de ATPasa e IF1 (De los Rios Castillo y cols., 2011) y otro estudio muestra que el aumento de IF1 favorece el ensamblaje de ATPasa en cardiomiogénesis (Bisetto y cols., 2013).

Sin embargo, otros autores, encuentran la misma cantidad de dímeros IF1-F1 en células HeLa con IF1 genética y establemente disminuido que en células control (Fujikawa y cols., 2012). IF1 bovino se encuentra presente tanto en monómeros como en dímeros de ATPasa y el ratio dímero/monómero no se altera aunque se varíe el contenido de IF1 o las condiciones de unión del inhibidor a la ATPasa (Tomasetig y cols., 2002). Por último, la formación de dímeros de ATPasa no requiere de la presencia de IF1 en levaduras (Dienhart y cols., 2002). Probablemente, la tendencia

de IF1 a formar dímeros activos favorece la dimerización de ATPasa, y puede que IF1 estabilice el dímero formando un puente entre dos dominios F_1 (Minauro-Sanmiguel y cols., 2005). Sin embargo, IF1 no tiene porqué ser esencial en este proceso, ya que se conoce que los contactos esenciales y más estrechos para la dimerización de ATPasa se dan a nivel de los dominios F_o (subunidades e , g y b) (Minauro-Sanmiguel y cols., 2005).

En cualquier caso, se desconoce las implicaciones que la formación de dímeros tiene sobre la actividad de IF1 o de la ATPasa. Fragmentos de IF1 sin la secuencia para formar dímeros pero con la región inhibitoria conservan la actividad de IF1 (Harris, 1997). Además, la forma monomérica IF1- F_1 es capaz de disminuir la actividad enzimática a los mismos niveles que las formas dimericas por lo que se ha propuesto que ambas formas existen en equilibrio y que éste se desplaza hacia la formación de dímeros cuanto más IF1 hay presente (Dominguez-Ramirez y cols., 2001). Algunos resultados sugieren que la disposición en dímeros favorece la actividad de la ATPasa (Garcia y cols., 2006; Campanella y cols., 2008; Strauss y cols., 2008), aunque otros estudios afirman lo contrario (Tomasetig y cols., 2002), y otros mantienen que el estado de oligomerización de la ATPasa no afecta a la actividad de la enzima (Dominguez-Ramirez y cols., 2001; Wittig y cols., 2006).

1.3.4. Mecanismo de acción

IF1 inhibe la actividad de la ATPasa debido a la apertura del espacio de la interfase α/β de la ATPasa que produce la unión de su región central y N-terminal, alterando los cambios conformacionales que se dan en la catálisis rotatoria del enzima y posiblemente bloqueando también la rotación del brazo central de la ATPasa (Minauro-Sanmiguel y cols., 2002; Cabezon y cols., 2003; Garcia y cols., 2006; Gledhill y cols., 2007). Como resultado, la H^+ -ATP sintasa queda inhibida, tanto a nivel de síntesis/hidrólisis de ATP como a nivel de translocación de protones (Pansini y cols., 1978; Guerrieri y cols., 1987; Zanotti y cols., 2009). La unión y, por tanto, la acción de IF1 sobre la ATPasa es reversible, con una constante de disociación en el rango micromolar (Schwerzmann y cols., 1986). La potencia inhibitoria de IF1 se estima en un 85-90% de reducción en la actividad ATPasa (Galante y cols., 1981; Di Pancrazio y cols., 2004) cuando IF1 está unido (pH 6,5).

La asociación y disociación de IF1 de la enzima depende, además del pH, de otros factores, como el $\Delta\Psi_m$ y el ATP- Mg^{2+} . El ATP es necesario en la acción inhibitoria de IF1 (Galante y cols., 1981; Klein y cols., 1981; Power y cols., 1983; Di Pietro y cols., 1988; Lippe y cols., 1988; Khodjaev y cols., 1990; Sah y cols., 1993) ya que, al parecer, la hidrólisis de una o dos moléculas de ATP una vez que IF1 se une a F1ATPasa fijan la posición final de IF1, bloqueando sucesivos ciclos catalíticos (Penin y cols., 1988; Green y cols., 2000; Corvest y cols., 2005; Gledhill y cols., 2007), al mismo tiempo que deja atrapados nucleótidos de adenina en estos sitios (Klein y cols., 1981; Milgrom, 1991; Gledhill y cols., 2007). La hidrólisis de ATP ocurre en presencia de cationes divalentes, por lo que la presencia de Mg^{2+} es, así mismo, necesaria para la unión y acción inhibitoria de IF1 (Horstman y cols., 1970; Galante y cols., 1981; Klein y cols., 1981; Khodjaev y cols., 1990; Sah y cols., 1993). El $\Delta\Psi_m$ es igualmente determinante en la unión de IF1 a la ATPasa. Así, cuando la cadena respiratoria

genera un gradiente de protones, IF1 se libera del enzima (Gomez-Puyou y cols., 1979; Harris y cols., 1979; Klein y cols., 1981; Lippe y cols., 1988; Hashimoto y cols., 1990), posiblemente por un cambio estructural en la subunidad γ de la ATPasa mediado por la entrada de protones a través de F_o (Gledhill y cols., 2007) y/o por un cambio estructural en IF1 mediado por pH (Cabezón y cols., 2003). Sin embargo, este efecto es sólo visible en ausencia de ATP (Lippe y cols., 1988) que se libera, junto con IF1 (Penin y cols., 1988).

1.3.5. Funciones de IF1

Aunque la bioquímica y la estructura de IF1 están bien caracterizadas, la funcionalidad de esta proteína no ha experimentado un estudio tan detallado. IF1 ha sido tradicionalmente caracterizado *in vitro* como inhibidor de la hidrólisis de ATP cuando la ATPasa funciona de modo reverso (Figura 4B abajo). En primer lugar porque en los años 70-90 las partículas submitocondriales o la F1ATPasa soluble eran los modelos de estudio y, técnicamente, la reacción hidrolítica de ATP, es más sencilla de monitorizar que la reacción de síntesis, que requiere la presencia de un gradiente electroquímico. En segundo lugar, porque el estudio más exhaustivo de IF1 se ha llevado a cabo en circunstancias fisiológicas en las que la ATPasa se encuentra hidrolizando ATP en lugar de sintetizándolo (hipoxia).

En hipoxia cuando el $\Delta\Psi_m$ se colapsa porque se inhibe la respiración, se bloquea la síntesis de ATP mitocondrial y se incrementa el flujo glucolítico como consecuencia. El importe de ATP glucolítico a la mitocondria por la ANT es utilizado por la ATPasa para hidrolizar ATP (Zanotti y cols., 1987; Jennings y cols., 1991a) y a traslocar protones al espacio intermembrana para mantener el $\Delta\Psi_m$ (Hatefi, 1985) siempre que la provisión de ATP glucolítico sea suficiente. En estas circunstancias, la bajada de pH de la matriz por el colapso del gradiente electroquímico, la ausencia de fuerza protón-motriz y la presencia de ATP glucolítico hace posible la unión de IF1 a la ATPasa (Hashimoto y cols., 1990; Cabezón y cols., 2000b).

El papel inhibitorio de IF1 sobre la función hidrolítica de la ATPasa en hipoxia ha sido demostrado por primera vez en células intactas por modulación genética de la expresión de IF1 (Campanella y cols., 2008). En hipoxia, las células que sobre-expresan IF1 pierden el $\Delta\Psi_m$ en respuesta a FCCP más rápidamente que los controles y especialmente, que las células que tienen IF1 silenciado. Por el contrario, en las células con IF1 silenciado, el consumo de ATP por la ATPasa es más rápido y la consecuente muerte celular ocurre antes (Campanella y cols., 2008).

Sin embargo, se desconoce el papel que juega IF1 en normoxia. Algunos autores niegan que IF1 sea capaz de inhibir la actividad sintética de la ATPasa (Pullman y cols., 1963; Hashimoto y cols., 1990; Walker, 1994; Bason y cols., 2011) e incluso un estudio afirma que la sobre-expresión de IF1 aumenta la actividad OXPHOS (Campanella y cols., 2008). IF1 bloquea la catálisis rotatoria de la ATPasa fijando su conformación y puesto que la ATPasa no parece cambiar de conformación cuando funciona en un sentido u otro si no simplemente revertir el sentido de giro, parece lógico que IF1 unido a la ATPasa inhiba cualquiera de los sentidos de la reacción. Además, la regulación

de OXPHOS por IF1 dotaría a la célula de un mecanismo de regulación adicional para adaptarse a las necesidades energéticas de la célula (Harris y cols., 1991; Das, 2003).

Estudios preliminares han relacionado la baja actividad enzimática de la ATPasa y la elevada glucólisis de ciertos tumores con su elevado contenido en IF1 (Luciakova y cols., 1984; Chernyak y cols., 1991). Además, se sabe desde hace tiempo que el inicio de OXPHOS en respuesta a la reinstauración de fuerza protón motriz pasa por una fase de retardo que corresponde a la liberación de IF1 del complejo IF1-ATPasa (Harris y cols., 1978; Harris y cols., 1979; De Gomez-Puyou y cols., 1980; Lippe y cols., 1988) y en partículas submitocondriales de corazón bovino, se ha observado una asociación entre la expresión de IF1 y la inhibición de la actividad sintasa de la ATPasa (Husain y cols., 1983; Lippe y cols., 1988). Más recientemente, los MEFs de ratón que sobre-expresan IEX-1 (homólogo del IER-3 humano, favorece la degradación de IF1) son más dependientes de la glucólisis y menos de la OXPHOS (Shen y cols., 2009). Estas observaciones sugieren que IF1 podría inhibir la actividad ATP sintasa de la enzima en determinadas condiciones, aunque son necesarias evidencias directas en células intactas que permitan afirmar que éste es el caso.

1.3.5.1. Isquemia cardiaca

Su implicación en isquemia cardiaca ha sido la principal y casi exclusiva función fisiológica atribuida a este inhibidor. En corazón, la velocidad de depleción de ATP determina el daño necrótico tras un periodo de isquemia, siendo la ATPasa la responsable del 50-80% de la rápida depleción de ATP que acontece en esta situación. Factores que previenen este gasto de ATP protegen o retrasan el daño necrótico isquémico (Jennings y cols., 1991b; Allue y cols., 1996; Grover y cols., 2004) e IF1, al igual que la oligomicina, es uno de ellos.

Al parecer, la variable susceptibilidad a isquemia que se observa entre especies depende de los niveles y de la afinidad de IF1 (Rouslin, 1991; Rouslin y cols., 1995; Rouslin y cols., 1996) de tal forma que la actividad inhibitoria de IF1 disminuye la depleción de ATP durante isquemia, retrasando el daño y la muerte celular (Rouslin y cols., 1990; Rouslin, 1991). El preconditionamiento o resistencia a isquemia observada en un tejido que ha sufrido breves periodos de isquemia subletal reduce la depleción de ATP durante la isquemia, fenómeno que ha sido atribuido a la inhibición de la actividad hidrolítica por IF1 (Vuorinen y cols., 1995; Di Pancrazio y cols., 2004). En corazón de cabra, el preconditionamiento produce una acumulación de IF1 y de IF1-F1ATPasa respecto a los animales no sometidos al preconditionamiento y durante la isquemia y posterior reperusión, los corazones preconditionados mantienen unos niveles de IF1-F1ATPasa más elevados y constantes y una actividad ATPasa menor (Di Pancrazio y cols., 2004). Además, el diazóxido, fármaco cardioprotector utilizado en casos de infarto de miocardio, aumenta la inhibición de la ATPasa en isquemia y favorece la unión de IF1 (Contessi y cols., 2004). En resumen, IF1 tiene un papel cardioprotector al retrasar la depleción de ATP responsable del daño necrótico durante la isquemia.

1.3.5.2. Muerte celular

IF1 parece tener un papel en la regulación de muerte celular. Así, células HeLa con IF1 silenciado son más sensibles que las células que sobre-expresan IF1 a autofagia cuando son tratadas con H_2O_2 o rapamicina (Campanella y cols., 2009). Igualmente, la sobre-expresión de IF1 produce un aumento de ROS mitocondriales moderado que promueve una señal retrógrada al núcleo por activación de la vía canónica de NF κ B en células de carcinoma de colon (HCT116 y SW620) (Formentini y cols., 2012). Resultados similares se han obtenido en células tumorales de mama, ovario y pulmón, aunque parece que la señal de supervivencia de IF1 varía de un tipo celular a otro (Sanchez-Arago y cols., 2013b). Un reciente estudio sugiere que IF1 previene los cambios en la estructura mitocondrial tras un estímulo apoptótico impidiendo la liberación de citocromo c y la señalización por Ca^{2+} subsiguiente que favorece la apertura del PTP (Faccenda y cols., 2013).

1.3.5.3. Diferenciación/desdiferenciación celular

El proceso de diferenciación conlleva una reprogramación metabólica que incluye un aumento de la biogénesis, actividad, maduración y expansión de la red mitocondrial. Un reciente estudio de nuestro laboratorio muestra que IF1 interviene en la diferenciación mitocondrial que acontece en la diferenciación osteocítica a partir de hMSC ya que los osteocitos reducen drásticamente su contenido en IF1 a la par que aumentan la expresión de proteínas de la OXPHOS y se reducen las de glucólisis (Sanchez-Arago y cols., 2013c). El silenciamiento de IF1 en hMSC produce un aumento de la actividad ATP sintasa y una caída de glucólisis, sugiriendo la participación de IF1 en el cambio metabólico que sucede en la inducción osteogénica a partir de hMSC (Sanchez-Arago y cols., 2013c). Es decir, IF1 estaría contribuyendo a mantener las características de pluripotencia de las hMSC inhibiendo la actividad mitocondrial y puede ser considerado, por tanto, un marcador de pluripotencialidad (Kraft y cols., 2006; Chen y cols., 2008; Rehman, 2010; San Martin y cols., 2011). La participación de IF1 en este proceso también ha sido sugerida en células iPS obtenidas a partir de MEFs ya que muestran un aumento de IF1 que, junto con los bajos niveles de β F1ATPasa, limita tanto la OXPHOS como el consumo de ATP (Vazquez-Martin y cols., 2013). Sin embargo, otro estudio sugiere que IF1 favorece la diferenciación cardiomiogénica al incrementar el superensamblaje de ATPasa (Bisetto y cols., 2013).

1.3.5.4. Cáncer

Existen evidencias que implican a IF1 en el proceso tumoral. En hepatoma y sarcoma de rata, IF1 está aumentado 2-3 veces y la actividad ATPasa disminuida respecto a tejidos normales (Luciakova y cols., 1984). En mitocondrias de hepatoma de ratón, la actividad ATPasa es también menor respecto a mitocondrias de hígado de ratón y este efecto, que es dependiente de $\Delta\Psi_m$, pH y ATP, ha sido atribuido a una mayor cantidad de IF1 en las mitocondrias tumorales (Chernyak y cols., 1991). La expresión de IF1 en hepatoma de rata es el doble que en hígado normal de rata, lo cual correlaciona con una mayor cantidad de IF1 unido a ATPasa según estudios de cross-linking y

con una disminución de la liberación de IF1 de la enzima (Bravo y cols., 2004). En células de carcinoma ascítico de Ehrlich, la oligomicina tiene menos efecto que en timocitos de rata, disminuyendo la actividad ATPasa en presencia de un desacoplante (Chernyak y cols., 1994). Finalmente, la expresión y actividad de IF1 es mayor en células de hepatocarcinoma humano menos diferenciadas respecto a otras más diferenciadas (Domenis y cols., 2011). La inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial por IF1 en células tumorales podría estar contribuyendo al cambio bioenergético hacia un perfil glucolítico observado en la mayoría de los cánceres humanos (ver sección 1.1.3).

1.3.5.5. *Otras funciones de IF1*

En línea con su papel mediador de supervivencia, se ha propuesto que IF1 actúa como **hepatoprotector**. El tratamiento con propiltiouracilo que protege a ratas de la hepatotoxicidad inducida por paracetamol aumenta la concentración y actividad de IF1, manteniendo los niveles de ATP hepático (Banerjee y cols., 1998). Por otro lado, el fallo bioenergético hepático que sucede en situación de sepsis terminal en rata por un aumento de la actividad hidrolítica de la ATPasa cursa con una disminución de la cantidad de IF1 (Hsieh y cols., 2004; Huang y cols., 2007).

Un estudio reciente pone de manifiesto una relación entre IF1 y activación de **mitofagia** en células desacopladas de tal forma que la caída de potencial de membrana por la inhibición de la ATPasa desestabiliza la proteína PINK1 en la membrana externa mitocondrial, favoreciendo el reclutamiento de PARK2 a la mitocondria (Lefebvre y cols., 2013).

La **enfermedad de Luft's** es una rarísima miopatía mitocondrial (sólo se han descrito dos casos) (Luft y cols., 1962; Haydar y cols., 1971) caracterizado por un hipermetabolismo no tiroideo y la presencia de mitocondrias con una gran cantidad de crestas (DiMauro y cols., 1976; Luft, 1992). Fibroblastos de pacientes con esta enfermedad carecen de IF1 (Yamada y cols., 1992), pero no está claro si este defecto puede ser atribuido a los síntomas de esta patología (Green y cols., 2000).

Finalmente, se ha propuesto a IF1 como un regulador de la **síntesis del grupo hemo** ya que el modelo mutante de pez cebra *pnt* anémico presenta un menor contenido de hemoglobina en sus eritrocitos debido a la disrupción del gen *atpif1* causado por un polimorfismo en su 3'-UTR (Shah y cols., 2012). La proteína Atpif1 aumenta su expresión durante la maduración eritropoyética, al igual que otras proteínas requeridas para la síntesis de hemo como la ferroquelatasa y mitoferrina 1 (Shah y cols., 2012). El estudio demuestra que Atpif1 interviene en la regulación de la síntesis de hemo regulando la eficiencia catalítica de la ferroquelatasa para sintetizar el grupo hemo en vertebrados (Shah y cols., 2012). La actividad ferroquelatasa es sensible a pH y al potencial redox a través de sus centros [2Fe/2S], por lo que IF1 regula su actividad manteniendo estos parámetros en niveles que no inhiben su actividad (Shah y cols., 2012).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La H⁺-ATP sintasa mitocondrial es una enzima clave en la generación de energía biológica y en la ejecución de la muerte celular. A pesar de su gran importancia en el mantenimiento de la homeostasis celular, su regulación no está completamente descrita. La alteración de su nivel normal de expresión está relacionada con distintas patologías humanas, incluyendo el cáncer. IF1 es un inhibidor específico de esta enzima que podría actuar regulando la actividad de la H⁺-ATP sintasa. Aunque IF1 se ha descrito hace más de cinco décadas, se conoce poco sobre esta pequeña molécula que interacciona con una de las enzimas más importantes de la célula aerobia. Es por ello que el objetivo principal de este estudio es contribuir a la caracterización de la función biológica de IF1 y su posible implicación en patología humana, concretamente en cáncer. En particular, con este trabajo se pretenden lograr los siguientes objetivos concretos:

1. Estudio de la función biológica de IF1 en células de mamífero.
2. Papel de IF1 en cáncer y estudio de la relevancia clínica de su expresión en cáncer de mama.
3. Desarrollo de modelos murinos de sobre-expresión condicionada y tejido específica de IF1 o de su forma mutante H49K.
4. Caracterización fenotípica de ratones transgénicos con sobre-expresión condicionada de H49K en hígado. Efecto de la inhibición de la H⁺-ATP sintasa en hepatocarcinogénesis.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Muestras humanas

Todas las muestras humanas utilizadas en este trabajo han sido recibidas codificadas con objeto de preservar la confidencialidad de los pacientes. Los estudios que se han realizado han sido aprobados por el Comité de Ética de la Universidad Autónoma de Madrid, del IDIBAPS (Instituto de Investigaciones Biomédicas Augusto Pi y Suñer) y del Hospital Universitario de La Paz. Las **muestras humanas normales y tumorales utilizadas en western blot** se adquirieron en secciones de 20 μ m de espesor de biopsias congeladas (-80°C) del Banco de Tejidos y Tumores del IDIBAPS-Hospital Clinic de Barcelona. Las secciones de tejido normal y tumoral de cada paciente fueron previamente analizadas por un patólogo. Para más información, consultar (Isidoro y cols., 2004). Las 93 **muestras de tumores de mama** utilizadas en el estudio de la expresión de IF1 por *western blot* consisten en muestras de tejido de adenocarcinoma de mama infiltrante de pacientes sometidos a cirugía en el Hospital Universitario de La Paz entre 1991 y 2000. Para más información, ver (Isidoro y cols., 2005). Las **muestras humanas normales y tumorales utilizadas en inmunohistoquímicas** proceden del *array* de tejidos *TissueFocus Cancer Survey Tissue Microarray* (OriGene Technologies, Rockville, MD, EE.UU.). Éste consiste en secciones de 165 x 1 mm fijadas en formaldehído y embebidas en parafina de 110 muestras tumorales y 55 normales de 11 tipos de cáncer: mama, colon, pulmón, hígado, ovario, endometrio, estómago, próstata, melanoma, hígado y linfoma.

3.1.2. Líneas celulares

A continuación se enumeran las líneas celulares utilizadas, junto con el laboratorio proveedor, número de referencia y origen.

A549 (ATTC, Manassas, VA, EE.UU, CCL-185), derivada de carcinoma de pulmón humano.

HCT 116 (ATCC, CCL-247) derivada de carcinoma de colon humano.

HEK 293T (ATCC, CRL-1573) derivada de células de riñón embrionario humano transformadas con adenovirus 5.

HeLa (ATCC, CCL-2), derivada de cáncer de cuello de útero humano.

HeLa Tet-Off Advanced (Clontech, Mountain View, CA, EE.UU., 631156), derivada de cáncer de cuello de útero humano. Expresa *tTA* optimizado para la expresión eucariota.

Hep G2 (ATCC, HB-8065), derivada de carcinoma hepatocelular humano.

Hep G2 Tet-On Advanced (Clontech, 631150) derivada de carcinoma hepatocelular humano. Expresa *rtTA* optimizado para la expresión eucariota.

Hepa 1-6 (ATCC, CRL-1830), derivada de hepatoma de ratón.

HS 578T (ATTC, HTB-126), derivada de carcinoma de mama humano.

NRK (ATCC, CRL-6509), derivada de células de riñón normal de rata.

T-47D (ATTC, HTB-133), derivada de carcinoma ductal humano.

T-47D Tet-On (Clontech, 631144), derivada de carcinoma ductal humano. Expresa *rtTA*.

3.1.3. Ratones

Se utilizó la línea salvaje **BALB/c** (Harlan Laboratories, Indianapolis, IN, EE.UU.) para la generación de anticuerpos monoclonales y la línea salvaje **C57BL6** (Harlan Laboratories) para el análisis de los niveles de IF1 en distintos tejidos murinos y en los cruces de mantenimiento de las líneas transgénicas.

La línea transgénica *STOCK-Tg(CMV-rtTA)4Bjd/J* o **CMV-rtTA** (003273, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EE.UU.) expresa el transactivador *On* de forma ubicua (Kistner y cols., 1996). La línea transgénica *B6.CBA-Tg(CamK2a-tTA)1Mmay* o **CamKII α -tTA** (amablemente cedida por el Dr. José J. Lucas, CBMSO) expresa el transactivador *Off* en cerebro anterior (Mayford y cols., 1996){Kistner, 1996 #15588}. La línea transgénica *B6.Cg-Tg(Cebpb-rtTA*S2)1Bjd/Cnrm* o **LAP-rtTA** (00404, repositorio EMMA, Monterotondo, Italia) expresa el transactivador *On* en hígado (Urlinger y cols., 2000; Schonig y cols., 2002). La línea transgénica *B6.Cg-Tg(Cebpb-tTA)5Bjd/J* o **LAP-tTA** (003563, The Jackson Laboratory) expresa el transactivador *Off* en hígado (Kistner y cols., 1996).

3.1.4. Bacterias

Para el clonaje, mantenimiento y amplificación de plásmidos se utilizaron las cepas de *E.coli* DH5 α , XL1Blue MRF' y JM110 (Servicio de Fermentación, CBMSO). La cepa de *E.coli* BL-21(DE3) (Servicio de Fermentación, CBMSO) fue utilizada para la expresión de la proteína IF1 humana recombinante (r-IF1).

3.1.5. Plásmidos

La Tabla 2 contiene todos los plásmidos utilizados, con información sobre el inserto que contiene, el promotor y su uso.

3.1.6. Anticuerpos

La Tabla 3 contiene la información de los plásmidos utilizados en este estudio, con el origen animal de cada uno, la dilución utilizada y el tamaño de la banda que detecta.

3.1.7. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos fueron diseñados con el programa *Primer3* (<http://primer3.ut.ee/>) (Ro-

Tabla 2: Plásmidos. Nombre: indica el inserto que contiene el plásmido, si procede; Inserto: Describe la secuencia de DNA incluida en el plásmido, con el identificador GeneBank entre paréntesis; Derivado de: indica el plásmido base sobre el que se ha clonado el inserto; Uso: indica la utilización del plásmido en este trabajo, con el identificador GeneBank entre paréntesis para la proteína que se expresa, si procede y los promotores que contiene; Origen: nombre de la empresa o laboratorio (Lab.) proveedor del plásmido; Entre paréntesis, las referencias dónde se puede encontrar el procedimiento de clonaje del plásmido; h: humano; r: rata.

Nombre	Inserto	Derivado de	Uso	Origen
pCMV-SPORT6-IF1(h)	cDNA <i>IF1</i> (BC009677)	<i>pCMV-SPORT6</i>	Clonaje, expresión eucariota de IF1(h) (AAH09677). P _{T7} , P _{SP6} , P _{CMV}	ATCC (Manassas, VA, EE.UU.)
pGEM-Teasy	-	-	Clonaje. P _{T7} , P _{SP6} .	Promega (Madison, WI, EE.UU.)
pGEM-IF1(h)	cDNA <i>IF1</i> (BC009677)	<i>pGEM-Teasy</i>	Clonaje. P _{T7} , P _{SP6} .	Lab. JM Cuezva (este trabajo)
pQE-Trisystem His-Strep 1	-	-	Clonaje. P _{actina pollo} , P _{T5} , P _{p10} .	Quiagen (Hilden, Alemania)
pQE-IF1(h)	cDNA <i>IF1</i> (BC009677)	<i>pQE-Trisystem His-Strep 1</i>	Clonaje y expresión de IF1(h) (AAH09677) en bacterias. P _{actina pollo} , P _{T5} , P _{p10} .	Lab. JM Cuezva (este trabajo)
pCMV-SPORT6-H49K(h)	cDNA <i>IF1</i> mutante	<i>pCMV-SPORT6</i>	Clonaje, expresión eucariota de IF1(h) mutante, H49K. P _{T7} , P _{SP6} , P _{CMV}	Lab. JM Cuezva (AD. Ortega, 2009 y este trabajo)
pEGFP-C2	Gen <i>gfp</i> mutado (mut1)	-	Clonaje <i>pEGFP-C2-pre8(r)</i> . P _{CMV} , P _{SV40} .	Clontech (Mountain View, CA, EE.UU.)
pEGFP-C2-pre8(r)	Gen <i>gfp</i> mutado (mut1) y con la presecuencia mitocondrial de la β F1 de rata.	<i>pEGFP-C2</i>	Expresión eucariota de GFP mitocondrial, marcador y control de transfección. P _{CMV} , P _{SV40} .	Lab. JM Cuezva
pBI-GL	Gen luciferasa, <i>luc</i> , y gen <i>lacZ</i>	-	Expresión eucariota simultánea y regulada por doxiciclina de luciferasa y β -galactosidasa, control de transfección. 2 x P _{minCMV} .	Clontech (Mountain View, CA, EE.UU.)
pBI-L	Gen luciferasa, <i>luc</i>	-	Clonaje de <i>IF1</i> y <i>H49K</i> . 2 x P _{minCMV} .	Clontech (Mountain View, CA, EE.UU.)
pBI-L-IF1(h)	Gen <i>luc</i> , y cDNA <i>IF1</i>	<i>pBI-L</i>	Expresión eucariota simultánea y regulada por doxiciclina de luciferasa e IF1(h). 2 x P _{minCMV} .	Lab. JM Cuezva (este trabajo)
pBI-L-H49K(h)	Gen <i>luc</i> , y cDNA <i>IF1</i> mutante	<i>pBI-L</i>	Expresión eucariota simultánea y regulada por doxiciclina de luciferasa e IF1(h) mutante, H49K. 2x P _{minCMV} .	Lab. JM Cuezva (este trabajo)
pTRE2hyg	-	-	Clonaje de <i>IF1</i> y <i>H49K</i> . P _{SV40} , P _{minCMV} .	Clontech (Mountain View, CA, EE.UU.)
pTRE2hyg-IF1(h)	cDNA <i>IF1</i> (BC009677)	<i>pTRE2hyg</i>	Expresión eucariota regulada por doxiciclina de IF1(h) (AAH09677). P _{SV40} , P _{minCMV} .	Lab. JM Cuezva (este trabajo)
pTRE2hyg-H49K(h)	cDNA <i>IF1</i> mutante	<i>pTRE2hyg</i>	Expresión eucariota regulada por doxiciclina de IF1(h) mutante, H49K. P _{SV40} , P _{minCMV} .	Lab. JM Cuezva (este trabajo)

zen y cols., 2000) con un tamaño óptimo de unos 20 pb y temperatura de fusión (T_m) óptima de entre 50 y 60°C y se comprobó con *OligoCalc* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) (Kibbe, 2007) que no formaban dímeros ni horquillas. Se adquirieron 5 U de A_{260nm} de cada oligonucleótido, purificados por HPLC (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El liofilizado se resuspendió a 4°C en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 2 mM) para obtener una concentración final del oligonucleótido de 100 μ M y se conservó a -20°C. La Tabla 4 contiene una lista de los oligonucleótidos que se han utilizado en este trabajo, sus secuencias, tamaño, T_m y la T_a utilizada en PCR.

Tabla 3: Anticuerpos primarios. Antígeno: nombre del antígeno reconocido por el anticuerpo; PM: peso molecular (kDa); Origen: animal usado para la producción del anticuerpo; Productor: empresa o laboratorio (Lab.) donde se ha producido el anticuerpo; Uso: utilización del anticuerpo en este estudio (WB: western blot, IF: inmunofluorescencia, IHQ: Inmunohistoquímica) y, entre paréntesis, la dilución empleada.

Antígeno	PM (kDa)	Origen	Productor	Uso
IF1	10	Ratón (monoclonal)	Molecular Probes A-21355	WB (1:200)
IF1	10	Ratón (policlonal)	Lab. JM Cuezva	WB (1:200)
IF1	10	Ratón (monoclonal)	Lab. JM Cuezva	WB (1:200), IF (1:100) IHQ (1:200)
β -F1-ATPasa	52	Conejo (policlonal)	Lab. JM Cuezva	WB (1:20000)
β -Actina	42	Ratón (monoclonal)	Sigma, A1978	WB (1:100000)
α -Tubulina	60	Ratón (monoclonal)	Sigma, T5169	WB (1:1000)
NADH DH sub 9	42	Ratón (monoclonal)	Lab. JM Cuezva	WB (1:2000)
SDH sub b	32	Ratón (monoclonal)	Molecular Probes, A21345	WB (1:500)
cit bc ₁ sub core2	48	Ratón (monoclonal)	MitoSciences, ab14745	WB (1:1000)
COX sub I	38	Ratón (monoclonal)	Molecular Probes 35-38100	WB (1:250)
COX sub IV	19	Ratón (monoclonal)	Molecular Probes, A21348	WB (1:250)
Hsp60	60	Ratón (monoclonal)	Stressgen, SPA-807	WB (1:2000)
GAPDH	35	Ratón (monoclonal)	Abcam, ab8245	WB (1:20000)
LDH-A	37	Ratón (sobrenadante hibridomas)	Lab. JM Cuezva	WB (1:1000)
AMPK α	62	Conejo (policlonal)	Cell Signalling, 2532	WB (1:1000)
pAMPK α	62	Conejo (policlonal)	Cell Signalling, 2531	WB (1:1000)
SOD-2	25	Conejo (policlonal)	Abcam, ab13533	WB (1:500)
Catalasa	60	Conejo (policlonal)	Lab. JM Cuezva	WB (1:500)
UCP2	35	Cabra (policlonal)	Santa Cruz Biotechnology, sc-6525	WB (1:200)

3.1.8. Otros materiales

Los reactivos generales de laboratorio, sales, etc... son, salvo que se indique lo contrario, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU).

3.2. MÉTODOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

3.2.1. Clonaje, expresión y purificación de la proteína IF1 recombinante (r-IF1)

El cDNA de IF1 contenido en el plásmido *pCMV-SPORT6-IF1* (identificador I.M.A.G.E. del clon: 3877506, identificador GenBank: BC009677) fue amplificado por PCR utilizando los oligonucleótidos Fw-IF1pGEM-SacI y Rv-IF1pGEM-NotI (Tabla 4) que añaden un sitio de restricción para Sac I y Not I respectivamente. El producto de PCR purificado fue clonado en el plásmido *pGEM-Teasy* (Tabla 2) y después en el plásmido *pQE-Trisystem* (Tabla 2) utilizando estos sitios de restricción. Con el plásmido resultante, *pQE-IF1* (Tabla 2), se transformaron bacterias *E. coli* BL-21 por choque térmico

Tabla 4: Oligonucleótidos. El nombre contiene un nombre resumido del amplicón, el plásmido de destino, el nombre de la diana de restricción que contiene y la orientación respecto al molde (Fw = misma orientación o Rv = orientación opuesta). La secuencia está dada en dirección 5'-3' y contiene la diana de restricción subrayada. El uso describe brevemente la utilización del oligonucleótido en este trabajo, con el tamaño del amplicón entre paréntesis si procede. La T_m indica la temperatura de fusión del oligonucleótido (*melting temperature*) y la T_a la temperatura de anillamiento utilizada en el programa de PCR.

Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso	T_m (°C)	T_a (°C)	Longitud (pb)
Fw-IF1pGEM-SacI	CGCGAGCTCATGGCAGTGACGGC	Clonación <i>IF1</i> en pGEM-Teasy (264 pb)	64	62	23
Rv-IF1pGEM-NotI	ATAGTTTAGCGGCCGCATCATCATGTTTATAGC	Clonación <i>IF1</i> en pGEM-Teasy (264 pb)	62	62	32
Fw-pQE	GTTATTGTGCTGTCTCATC	Secuenciación pQE-IF1	47	47	19
Rv-pQE	TCGATCTCAGTGGTATTTGTG	Secuenciación pQE-IF1	51	51	21
Fw-H49K	AACACAAGGAAGAAGAAATCGTTC	Generación del mutante <i>H49K</i>	52	43	24
Rv-H49K	GAACGATTTCTTCTCCTTGTT	Generación del mutante <i>H49K</i>	52	52	24
Fw-T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Generación del mutante <i>H49K</i> /secuenciación	48	43/48	20
Rv-SP6	ATTTAGGTGACACTAG	Generación del mutante <i>H49K</i> /secuenciación	41	37/41	18
Fw-pBI	CGGGGATCTCTAGTCAGC	Secuenciación pBI-L-IF1 y pBI-L-H49K	55	52	19
Rv-pBI	AATCAAGGGTCCCAAACTC	Secuenciación pBI-L-IF1 y pBI-L-H49K	52	52	20
Fw-IF1pTRE2-BamHI	CGTCGGATCCCGCTCCGC	Clonación <i>IF1</i> y <i>H49K</i> en pTRE2hyg	62	54	19
Rv-IF1pTRE2-NotI	TAGAGCGGCCGCCTTTT	Clonación <i>IF1</i> y <i>H49K</i> en pTRE2hyg	54	54	20
Fw-pTRE2	TTGCATACTTCTGCCTGCTG	Secuenciación pTRE2hyg-IF1 y pTRE2hyg-H49K	52	52	20
Rv-pTRE2	TTTTGTGATGCTCGTCAGG	Secuenciación pTRE2hyg-IF1 y pTRE2hyg-H49K	50	50	20
Fw-IF1	CACAGAGTAGAGAACTG	Genotipaje <i>IF1</i> o <i>H49K</i> (235 pb)	56	58	20
Rv-IF1	TTTGTCTGTGCTACTAAC	Genotipaje <i>IF1</i> o <i>H49K</i> (235 pb)	54	58	20
Fw-Tet	CATTATTACGACAAGCTATC	Genotipaje de <i>rtTA</i> o <i>tTA</i> (472 pb)	52	57	20
Rv-Tet	GTAACATCTGCTCAAACT	Genotipaje de <i>rtTA</i> o <i>tTA</i> (472 pb)	51	57	19
Fw-TetAdv	GTGCTCTCTCTACATC	Genotipaje de <i>rtTA Advanced</i> (345 pb)	56	58	18
Rv-TetAdv	ACTTTAGCTGTTCTCCA	Genotipaje de <i>rtTA Advanced</i> (345 pb)	50	58	18

y se indujo la expresión de la proteína recombinante IF1 añadiendo IPTG 1mM (Sigma-Aldrich) al medio de cultivo en crecimiento. Se dejó expresar toda la noche, se recogieron las bacterias y se resuspendieron en Solución A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 100 mM, NaCl 300 mM, pH 8) suplementado con lisozima 1 mg/ml. Finalmente, se centrifugaron las bacterias y se purificó la proteína recombinante IF1 a partir del precipitado sonificado usando la resina Ni-NTA (QIAGEN, Hilden, Alemania). La pureza de la proteína IF1 recombinante fue evaluada por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (sección 3.3.2).

3.2.2. Generación de anticuerpos poli y monoclonales anti-IF1

Los anticuerpos policlonales se obtuvieron del suero de ratones BALB/c inmunizados varias veces con inyecciones intraperitoneales de 20 μg de r-IF1 (sección 3.2.1). Los **hibridomas** para la generación de anticuerpos monoclonales anti-IF1 se generaron por fusión de las células de bazo de los ratones inmunizados con células SP2 en medio HAT-RPMI 1640 con polietilenglicol de acuerdo con las técnicas previamente descritas (Milstein, 1999; Nelson y cols., 2000). Los sobrenadantes de los cultivos de las distintas colonias obtenidas fueron testados por ELISA en placas recubiertas con r-IF1 (0-150 ng por pocillo). Los anticuerpos unidos se detectaron utilizando anticuerpos secundarios de cabra contra las IgGs de ratón conjugados con peroxidasa (1:1000, DAKO, Carpinteria, CA, EE.UU.). Se aislaron clones a partir de las colonias positivas por dilución límite y se volvieron a testar por ELISA. Los clones positivos fueron finalmente expandidos para la producción a gran escala de anticuerpos monoclonales. Para la purificación de anticuerpos presente en el sobrenadante de los cultivos se utilizó el kit *Montage* (Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.2.3. Aislamiento y purificación de DNA

Las preparaciones de plásmidos para clonaciones, secuenciación o transfección se realizaron utilizando distintos kits según el volumen de cultivo saturado de bacterias de partida: *QIAprep Spin Miniprep Kit* (2 ml de cultivo), *QIAGEN Plasmid Midi Kit* (50 ml) y *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (150 ml) (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA contenido en una banda de gel de agarosa recortada se purificó con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Madison, WI, EE.UU.). El DNA de ratón para genotipar se extrajo de biopsias de 0,5 cm aproximadamente de cola del animal con el robot *Maxwell16 Research Instrument System* y el kit *Maxwell® 16 Mouse Tail DNA Purification Kit* (Promega).

3.2.4. Cuantificación y calidad de DNA aislado y purificado

La cuantificación de DNA se realizó mediante la medida de absorbancia a 260 nm (A_{260}) utilizando un espectrofotómetro *Nanodrop® ND-1000* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU) y por comparación respecto a un patrón conocido en electroforesis en gel de agarosa. La calidad de las preparaciones de DNA se valoró siguiendo varios criterios espectrofotométricos: (i) no contaminación de proteínas ($A_{260}/A_{280} > 1,9$), (ii) no contaminación de polisacáridos ($A_{260}/A_{230} > 1,9$) y electroforéticos: (iii) no contaminación de RNA, (iv) forma plasmídica mayoritaria circular superenrollada y cantidad de DNA genómico despreciable.

3.2.5. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La identificación y análisis de la calidad del DNA se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % en TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 2 mM pH 8) con el intercalante de DNA *Gel-Red®* (Biotium, Hayward, CA, EE.UU.) con unos 0,5 µg de plásmido purificado o 10 µl de PCR por pocillo. La calibración de la cantidad de DNA y del tamaño de las moléculas de DNA se realizó mediante la electroforesis en paralelo de 2 µg de una mezcla de fragmentos de DNA de longitud y cantidad conocidas resultante de la digestión del DNA de los fagos λ y Φ29 con Hind III (Servicio de Genómica CBMSO) o del marcador comercial *1 Kb Plus* (Invitrogen).

3.2.6. Obtención y purificación del DNA transgénico para la microinyección pronuclear

Los fragmentos de DNA para generar ratones transgénicos *tetO-IF1* y *tetO-H49K* por microinyección pronuclear se obtuvieron por digestión de los plásmidos *pTRE2hyg-IF1* y *pTRE2hyg-H49K* respectivamente (Tabla 2). Los plásmidos fueron extraídos de cepas de *E.coli* JM1 10 transformadas y a continuación purificados y precipitados dos veces con fenol:cloroformo:isoamílico y etanol para aumentar la pureza del DNA. Los plásmidos resultantes fueron secuenciados para asegurar la integridad y fidelidad de las secuencias. Las digestiones fueron diseñadas para contener todos los elementos necesarios para la transcripción de *IF1* o *H49K* condicionada por doxiciclina en un fragmento de unos 2,5 Kb (tamaño óptimo para la microinyección) y con la menor cantidad posible

de secuencia procariota para evitar la metilación y destrucción del DNA (Figura 19). El plásmido *pTRE2hyg-IF1* fue digerido con las enzimas SexA I y BsrB I (New England Biolabs, Ipswich, MA, EE.UU.) y el vector *pTRE2hyg-H49K* con las enzimas SexA I y Drr I (New England Biolabs). Las digestiones fueron separadas por electroforesis en gel de agarosa utilizando TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8, 1 mM EDTA) como tampón ya que este tampón presenta menor toxicidad embrionaria que el TAE. El fragmento de 2,4 Kb de la digestión de *pTRE2hyg-IF1* y el de 2,6 Kb de la digestión de *pTRE2hyg-H49K* fue purificado con el kit *Elu-Quick DNA Purification Kit* (Whatman, Maidston, Reino Unido) a partir de la banda de agarosa recortada del gel. La identidad de los fragmentos fue comprobada por digestión con las enzimas BamH I y Not I que liberan el inserto (*IF1* o *H49K*). La secuencia nucleotídica de los fragmentos microinyectados puede consultarse en la Figura A2 del Anexo I.

3.2.7. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo mediante un termociclador *Mastercycler Personal*® (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) o en un *MyCycler*® *Thermal Cycler* (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.). La presencia de producto de PCR del tamaño adecuado (Tabla 4) se visualizó por electroforesis en gel de agarosa (ver sección 3.2.5).

3.2.7.1. Amplificación para clonaciones

Las amplificaciones se realizaron con 2,5 U de la polimerasa de alta fidelidad *Expand High Fidelity PCR system*® (Roche, Mannheim, Alemania) usando como molde 5 ng de plásmido puro en un volumen final de reacción de 50 µl, conteniendo MgCl₂ 1,5 mM, 0,1 µM de cada oligonucleótido y 0,1 mM de cada dNTP (Invitrogen) en el tampón proveído por el fabricante (Roche). El programa de tiempos y temperatura utilizado fue el siguiente: 1 ciclo de desnaturalización inicial (2 minutos a 94°C), 10 ciclos de amplificación (15 segundos a 94°C, 30 segundos de anillamiento, elongación a 68°C), 20 ciclos de amplificación en los que se añade 5 segundos de tiempo de elongación por cada ciclo sucesivo y un ciclo de elongación final (7 minutos a 72°C). La temperatura de anillamiento para cada reacción aparece en la Tabla 4 y el tiempo de elongación fue de 1 min/kb a amplificar.

3.2.7.2. Cribado de clones recombinantes

El cribado inicial de clones recombinantes tras una transformación se realizó por PCR en un volumen de reacción de 25 µl donde se introducen bacterias tomadas directamente de una colonia crecida en LB-Agar, MgCl₂ 2 mM, dNTPs 0,2 mM cada uno, 1 U de polimerasa *Biotoools DNA polymerase* (Biotoools B&M, Madrid, España) y 0,2 µM de cada oligonucleótido en el tampón de la enzima (Biotoools). El programa utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial (10 minutos a 94°C), 20-25 ciclos de amplificación (15 segundos a 94°C, 15 segundos a la T_a que aparece en la Tabla 4, 0,5 – 1 minuto a 72°C) y elongación final (3 minutos a 72°C).

3.2.7.3. Mutagénesis dirigida

Para la creación de la construcción mutante de IF1, H49K, se realizaron dos amplificaciones solapantes con oligonucleótidos externos usando como molde 10 ng de *pCMV-SPORT6-IF1*. Los componentes de la reacción y el programa son los mismos que en el apartado anterior excepto que para la amplificación del brazo izquierdo (oligonucleótidos Fw-H49K y Fw-T7, Tabla 4), la T_a fue de 43°C y en la del brazo derecho (oligonucleótidos Rv-H49K Rv-SP6, Tabla 4) de 37°C. El tiempo de elongación fue de 20 segundos en ambos casos.

3.2.7.4. Genotipado

El genotipaje de los ratones se llevó a cabo por PCR en un volumen final de 25 µl, utilizando 100 ng aproximadamente del DNA aislado de biopsias de cola de ratón (ver sección 3.2.3), $MgCl_2$ 2 mM, dNTPs 0,2 mM de cada uno, 0,5 µM de cada oligonucleótido, 1 U de polimerasa *Biotools DNA polimerase* (Biotools) y el buffer correspondiente para esta enzima (Biotools). Los programas de tiempo y temperaturas fueron previamente puestos a punto siguiendo el siguiente esquema general: un ciclo inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 39 ciclos de amplificación (desnaturalización 15 segundos a 94°C, hibridación 30 segundos a la T_a que aparece en la Tabla 4 y elongación 30 segundos a 72°C) y un ciclo de elongación final de 10 minutos a 72°C. Para garantizar la especificidad del producto amplificado, todos los genotipajes incluyen un control positivo (2 pg de plásmido conteniendo el transgén) y un control negativo (100 ng de DNA extraído de un ratón wt).

3.2.8. Clonaciones

Las clonaciones descritas a continuación, se realizaron siguiendo las técnicas y protocolos habituales en Biología Molecular (Sambrook y cols., 2001). Las **digestiones del DNA** con enzimas de restricción se llevaron a cabo en los tampones y a las temperaturas recomendados por el fabricante (Roche) manteniendo una concentración de glicerol < 10%. La **separación y purificación** de los fragmentos generados por digestiones o por PCR se llevó a cabo recortando la banda adecuada del gel de agarosa tras la electroforesis y purificando el DNA según se indica en la sección 3.2.3. Los fragmentos utilizados para realizar clonaciones no se expusieron a irradiación ultravioleta durante el proceso de purificación ya que se cargó en paralelo una alícuota de la digestión o PCR para localizar la banda de interés. La **desfosforilación** de los extremos digeridos del vector se llevó a cabo con 0,5 U de fosfatasa alcalina (CIP) (Roche) durante 30 minutos a 37°C. La fosfatasa se inactivó a 55°C 1h y el DNA se purificó mediante fenolización y precipitación o electroforesis. Las **ligaciones** se realizaron en una relación molar 1/3 de vector/inserto durante 5 minutos a temperatura ambiente con el *Quick ligation kit*® (New England Biolabs). Las **transformaciones** se realizaron con 1 ng de plásmido puro o con la mitad de la ligación (50-100ng de vector + inserto) mediante choque térmico en bacterias competentes (Servicio de Fermentación CBMSO, sección 3.1.4). El chequeo de colonias transformadas se realizó por PCR (sección 3.2.7.2) y/o por digestión del DNA aislado. Todas las construcciones que se describen a continuación han sido secuenciadas por el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid.

3.2.8.1. *pCMV-SPORT6-H49K*

La mutación de histidina por lisina de la posición 49 de la proteína IF1 humana se obtiene substituyendo el triplete CAT de la posición 220-222 del ORF por AAG, es decir, mediante una mutación puntual de dos nucleótidos en posición 220 y 222 del ORF. El plásmido *pCMV-SPORT6-H49K* se obtuvo a partir del *pCMV-SPORT6-IF1* por PCR mutagénica tal y cómo se describe en la sección 3.2.7.3. Brevemente, se amplificaron por PCR dos fragmentos solapantes que contienen la mutación utilizando para ello los oligonucleótidos mutagénicos Fw-H49K y Rv-H49K y los oligonucleótidos externos Fw-T7 y Rv-SP6. Estos fragmentos se usaron, a su vez, como cebadores y moldes en una reacción de anillamiento y extensión que se amplifica posteriormente usando los oligonucleótidos externos. El amplicón generado incluye dos dianas de restricción (EcoR I y Not I) externas al gen que se usaron para subclonar la construcción en el vector *pCMV-SPORT6* (Tabla 2). Los clones positivos se analizaron por secuenciación completa confirmándose la integración de la mutación H49K.

3.2.8.2. *pBI-L-IF1* y *pBI-L-H49K*

Estos plásmidos se generaron a partir del inserto aislado de los plásmidos *pCMV-SPORT6-IF1* y *pCMV-SPORT6-H49K* (Tabla 2) por digestión con las enzimas Not I y Mlu I (Roche) y posterior ligación en el plásmido pBI-L (Tabla 2) digerido previamente con las mismas enzimas.

3.2.8.3. *pTRE2hyg-IF1* y *pTRE2hyg-H49K*

Estos plásmidos se generaron amplificando por PCR el inserto en los plásmidos *pCMV-SPORT6-IF1* y *pCMV-SPORT6-H49K* (Tabla 2) con los oligonucleótidos Fw-IF1pTRE2-BamHI y Rv-IF1pTRE2hyg-NotI (Tabla 4) que incluyen un sitio de restricción para las enzimas BamH I y Not I. El producto purificado de la PCR fue clonado en el plásmido *pTRE2hyg* (Tabla 2) previamente digerido con estas enzimas.

3.3. MÉTODOS EN BIOQUÍMICA

3.3.1. Extracción y cuantificación de proteínas de muestras biológicas

Las proteínas de las muestras de **tejidos humanos** se extrajeron como en se describe en (Isidoro y cols., 2005) y como se describe en (Isidoro y cols., 2004) para el resto de muestras.

Las proteínas procedentes de **células en cultivo** se extrajeron a partir del sedimento celular resultante de la centrifugación tras despegar las células de la placa. Este sedimento fue resuspendido en 100 µl de tampón de lisis (Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 130 mM y Tritón X-100 al 0,5%) por cada 4 millones de células. Los tubos se agitaron durante 10 segundos con un “vórtex” y se mantuvieron a 4°C durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron durante 15 min a 11.000 x g

y a 4°C. El sobrenadante, conteniendo las proteínas, fue almacenado a -70°C.

Las proteínas procedentes de **tejidos de ratón** se extrajeron a partir del tejido pulverizado (sección 3.5.5) con 300 µl de tampón de extracción (Tris 50 mM pH 8, NaCl 1% (v/v), Triton X-100 1%, DTT 1 mM, SDS 0,1% (p/v), EDTA 0,4 mM pH 8, inhibidores de fosfatasa, cóctel de inhibidores de proteasas). Los extractos se sometieron a tres ciclos de congelación en N₂ líquido y descongelación a 30°C y se centrifugaron a 12.300 rpm durante 30 minutos. El sobrenadante, conteniendo las proteínas, fue almacenado a -70°C.

La cantidad de proteína total de los extractos de proteínas se determinó mediante el reactivo de Bradford (Bio-Rad) siguiendo las recomendaciones del fabricante y usando una solución de concentración conocida de BSA como patrón de referencia.

3.3.2. Electroforesis de proteínas en geles de SDS-poliacrilamida y *western blot*.

Las proteínas se fraccionaron mediante electroforesis en geles desnaturizantes de SDS-poliacrilamida 12 o 15% según el método descrito por Laemmli (Sambrook y cols., 2001). Todos los carriles de muestras fueron cargados con la misma cantidad de proteína (30 µg) y se cargó, además, una cantidad de control positivo normalizador adecuada para que la banda resultante fuese de una intensidad semejante a la de las muestras (20 o 60 µg de extracto de células HeLa o 20 ng de r-IF1). La calibración de la movilidad de las proteínas en los geles se efectuó mediante electroforesis en paralelo de un conjunto de proteínas teñidas de peso molecular conocido: 200; 97; 66; 45; 30; 21.5, y 14.3 kDa (*Rainbow markers*®, GE Healthcare, Waukesha, WI, EE.UU.). En el caso del estudio de la cohorte de adenocarcinomas de mama, se cargaron 25 µg de muestra y 25 µg de extracto de células Hs 578T en cada gel como control normalizador de los distintos geles.

La visualización de las proteínas en el gel se realizó mediante una tinción con azul de Coomassie. Las proteínas fraccionadas se transfirieron a membranas de PVDF (0,45 µm de poro) previamente activadas con metanol. La electro-transferencia húmeda se llevó a cabo con un equipo *Mini Trans Blot*® (Bio-Rad) en tampón de transferencia (Glicina 39 mM, Tris-HCl 48 mM, metanol 20% (v/v) y 0,0375% SDS) durante 45 minutos a 100 V y 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados en este estudio y sus diluciones se resumen en la Tabla 3. A continuación, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario de cabra contra IgGs de conejo, o con un anticuerpo de conejo contra IgGs de ratón conjugados ambos a peroxidasa (Nordic Immunology, Eindhoven, Países Bajos), 1:3000 en solución de bloqueo. En el caso de la inmunodetección de pAMPK, la leche desnatada liofilizada del bloqueo fue sustituida por *PhosphoBLOCKER Blocking Reagent* (Cell Biolabs, San Diego, CA, EE.UU.) y los anticuerpos se incubaron diluidos en este agente al 1%. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron por quimioluminiscencia (ECL, Invitrogen). Las bandas inmunoreactivas de las películas de rayos-X que estaban dentro del rango lineal de detección se cuantificaron con una cámara digital *Kodak DC120 Zoom* y el programa *Kodak 1D Image Analysis* (Kodak, Rochester, NY, EE.UU.) para Windows.

3.3.3. Determinación de la carbonilación de proteínas en hígado de ratón

Para la determinación de la carbonilación de proteínas se utilizó el kit *Oxyblot Oxidized Protein Detection Kit*® (Millipore). El método se basa en la detección y cuantificación de los grupos carbonilos en las cadenas laterales de las proteínas por derivación de éstos a dinitrofenilhidrazonas (DNP-hidrazona) por reacción con dinitrofenilhidracina (DNPH). Posteriormente, las muestras de proteína derivadas a DNP-hidrazonas se pueden separar en geles de poliacrilamida y seguir el protocolo habitual de *western blot* (sección 3.3.2) utilizando anticuerpos específicos para las regiones DNP-hidrazona de las proteínas. El anticuerpo primario anti-DPN se utilizó a una dilución 1:500 y el anticuerpo secundario a una dilución 1:300.

3.3.4. Determinación de la concentración de lactato

El método se fundamenta en la conversión de L-lactato a piruvato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia de NAD⁺ con la consiguiente formación de NADH, cuya concentración se determina espectrofotométricamente por el incremento de la absorbancia a una longitud de onda de 340nm. La adición de sulfato de hidracina permite el secuestro del piruvato formado, desplazando la reacción hacia la producción de piruvato (Gutmann y cols., 1974).

3.3.5. Determinación de metabolitos en sangre/suero de ratón

La **glucosa** se determinó en 50 µl de sangre desproteinizada y neutralizada (sección 3.5.5). El método se fundamenta en la conversión de D-glucosa en glucosa-6-fosfato y ésta a su vez en 6-fosfogluconato gracias a las enzimas hexokinasa (HK) y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) respectivamente en presencia de NADP⁺ con la consiguiente formación de NADPH. La concentración de éste se determina espectrofotométricamente por el incremento en la absorbancia a una longitud de onda de 340 nm (Bergmeyer y cols., 1974).

El **lactato** se determinó en 50 µl de sangre desproteinizada y neutralizada (sección 3.5.5) según se describe en la sección 3.3.4.

La determinación de la concentración de **aminoácidos, otros compuestos nitrogenados y acilcarnitinas** se realizó por el CEDEM (Centro de Diagnóstico de Enfermedades Moleculares) mediante cromatografía de intercambio iónico (aminoácidos y otros compuestos nitrogenados) y espectrometría de masas en tándem (MS/MS, acilcarnitinas) con 80 µl de sangre desproteinizada y neutralizada (sección 3.5.5).

La actividad de las **transaminasas hepáticas** aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en suero de ratón se realizó en un fotómetro *Reflotron Plus*® (Roche) usando las tiras correspondientes (referencia 10745120203 para AST y 10745138203 para ALT, Roche) con 30 µl de suero (sección 3.5.5) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.6. Determinación de la concentración de metabolitos en hígado de ratón

La concentración de **ATP** se determinó en extracto hepático desproteinizado y neutralizado (sección 3.5.5) utilizando el kit *ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II* (Roche). La luminiscencia se determinó en un luminómetro de placa *FLUOstar OPTIMA* (BMG Labtech, Ortenberg, Alemania).

La concentración de **piruvato, ADP y AMP** se determinó enzimáticamente en extracto hepático desproteinizado y neutralizado (sección 3.5.5) mediante una serie de reacciones acopladas (Jaworek y cols., 1974). i) La determinación de piruvato se basa en la conversión de piruvato en lactato por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH), ii) la determinación de ADP se basa en la reacción de conversión de este nucleótido en piruvato en presencia de fosfoenolpiruvato por la enzima piruvato kinasa (PK) acoplada a la reacción anterior (piruvato a lactato), iii) la determinación de AMP se basa en la reacción de conversión de este nucleótido en ADP por la enzima miokinasa (MK) acoplada a las dos reacciones anteriores (piruvato a lactato y ADP a piruvato). Estas reacciones se llevan a cabo en presencia de NADH, con la consiguiente formación de NAD⁺ que se detecta espectrofotométricamente por la disminución de la absorbancia a 340 nm.

El **lactato** se determinó en extracto hepático desproteinizado y neutralizado (sección 3.5.5) según se describe en la sección 3.3.4.

La determinación de la concentración de **ácidos orgánicos** se realizó por el CEDEM mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) con 450 µl de extracto hepático desproteinizado y neutralizado (sección 3.5.5).

3.4. MÉTODOS EN BIOLOGÍA CELULAR

3.4.1. Cultivo celular

Las **bacterias *E.coli*** fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB, Servicio de Preparación de Medios, CBMSO: bacto-triptona 1% p/v, extracto de levadura 0.5% p/v y NaCl 1% p/v) suplementado con el antibiótico de selección correspondiente (50-100 µg/ml). El crecimiento de las bacterias se llevó a cabo en incubadores a 37°C y, para los cultivos líquidos, en agitación. La conservación de las bacterias se realizó por congelación de glicerolados según técnicas descritas (Sambrook y cols., 2001).

Las **líneas celulares de mamífero** se cultivaron según técnicas habituales en cultivos celulares (Freshney, 2005). Los medios de cultivo utilizados fueron RPMI (líneas T-47D y T-47D Tet-On), McCoy's (línea HCT 116) o DMEM (el resto de líneas) suplementados al 10% con suero bovino fetal (FBS), excepto las líneas HeLa, HeLa Tet-Off Advanced y NRK que se cultivaron en medio suplementado al 5% de FBS. Todos los medios fueron, además, complementados con 2 mM glutamina, 100 UI/ml penicilina, 0,1 mg/ml estreptomycin y 400 µM de aminoácidos no esenciales (Ala, Asn, Asp, Glu y Pro). Los experimentos se llevaron a cabo en células que no acumulaban más de 25 pases a

no más del 70% de confluencia y sin contaminación por *Mycoplasma sp.* Los tests de detección de contaminación de *Mycoplasma* se realizaron mediante el kit *VenorGeM*® (Minerva Biolabs, Berlín, Alemania). Para recoger células adherentes, las placas o frascos se lavaron dos veces con PBS y se despegaron de la placa por tratamiento con una solución de tripsina 0,25%-EDTA 0,02% durante 3-5 minutos en el incubador. Finalmente, fueron recogidas añadiendo medio de crecimiento y centrifugando 5 minutos a 1200 rpm.

3.4.2. Transfección de plásmidos y silenciamiento

Para la transfección de plásmidos en células eucariotas se utilizaron preparaciones de alto grado de pureza (secciones 3.2.3 y 3.2.4) esterilizados por filtración con filtros de 0,2 µm (Millipore). Las células NRK, Hepa 1-6, HeLa Tet-Off Advanced y T-47D Tet-On, se transfectaron con los reactivos *Lipofectamine*® y *Plus Reagent*® (Invitrogen) y las células Hep G2 Tet-On se transfectaron con *JetPEI*® (Polyplus Transfection, Illkirch, Francia). Para cada línea, se utilizaron unas condiciones de transfección (cantidad de DNA, cantidad de reactivo y tiempo) previamente determinadas con el objetivo de conseguir el máximo nivel de transfección con la menor toxicidad celular. En todos los experimentos se transfectaron células en paralelo con un plásmido control (*pEGFP-C2-preβ(r)*, *pBI-GL*, o *pTRE2hyg-Luc*, Tabla 2) y se sometieron al mismo análisis que las muestras. En todos los casos, se cotransfectó con *pEGFP-C2-preβ(r)* (plásmido que codifica para GFP mitocondrial) en una relación 1:10 respecto al plásmido de interés. De esta forma, la intensidad de fluorescencia de GFP actúa como marcador de transfección y nos permite analizar selectivamente células transfectadas por citometría. El fenotipo se analizó a las 24 - 48 h post-transfección.

El gen IF1 se silenció con siRNA de *IF1* (Quiagen, S100908075) utilizando *Lipofectamine*® y *Plus Reagent*® (Invitrogen). Como control se transfectaron células con una secuencia de siRNA ineficiente, *Silencer*® *Select Negative Control #1 plasmid* (Ambion/Applied Biosystems, Austin, TX, EE.UU.)

3.4.3. Tratamientos celulares

Los tratamientos con oligomicina (OL) (Sigma-Aldrich) se realizaron a concentración 6 µM durante 2 horas el día del experimento, tras el cambio de medio para medir flujo glucolítico o antes de la tinción con TMRM⁺ para medir potencial de membrana. Los tratamientos con FCCP (Sigma-Aldrich) se realizaron a concentración 5 µM durante 30 minutos el día del experimento antes de la tinción con TMRM⁺ para medir potencial de membrana. Los tratamientos con doxiciclina (Sigma-Aldrich) se realizaron a concentración final de 1 ng/µl durante toda la noche. En las células Tet-On, se añadió el compuesto en el medio de cultivo tras 24-48h de transfección para inducir la expresión del gen de interés. En el caso de las células Tet-Off, se añadió desde la última fase de la transfección y, tras 24 horas, se lavaron las células varias veces con PBS y se añadió medio de cultivo nuevo sin doxiciclina para inducir la expresión del gen de interés.

3.4.4. Medida del flujo glucolítico

La determinación del flujo glucolítico se realizó midiendo la velocidad inicial de formación de lactato mediante la determinación de la concentración de este metabolito presente en el medio de cultivo. El día del experimento, se cambió el medio de cultivo por medio nuevo bajo en suero (0,5% FBS) y se tomaron alícuotas de 200 μ l del mismo al cabo de un tiempo de acumulación determinado, que fue previamente establecido en cada línea celular para que la producción de lactato a ese tiempo se encontrase en un tramo lineal. Las muestras se desproteinizaron precipitando con 4 volúmenes de ácido perclórico al 6%, se neutralizaron los sobrenadantes en presencia de indicador universal y se determinó su concentración de lactato según se describe en la sección 3.3.4.

3.4.5. Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para la determinación del potencial de membrana mitocondrial se utilizó el catión lipofílico metilester de tetrametilrodamina (TMRM⁺, Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.). Las células transfectadas y sometidas a diferentes tratamientos (sección 3.4.3) se incubaron en placa con la sonda diluida en el medio de cultivo a una concentración final de 0,5 μ M durante 10 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron las células dos veces con PBS y se recogieron por tripsinización. Siempre se analizó en paralelo una alícuota de células (transfectadas y sin transfectar) incubadas en ausencia de sonda para estudiar la morfología y el tamaño celular. Las muestras se analizaron por citometría de flujo (sección 3.4.6).

3.4.6. Citometría de flujo

Las células suspendidas en PBS (sección 3.4.1) se centrifugaron 5 min a 500 g a 4°C y el precipitado celular se resuspendió en solución de FACS (FBS 1%, Na₃N 0,1 % y PBS 1X). La suspensión celular se analizó en un citómetro de flujo *FACS Calibur*[®] (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU.) equipado con un láser de argón 15 mW y 488 nm. La fluorescencia verde (GFP) se registró a través de un filtro de detección de 530 nm y 30 nm de paso de banda. La fluorescencia naranja (TMRM⁺) se registró con un filtro de detección de 585 nm y 42 nm de paso de banda. El voltaje de los fotomultiplicadores y la compensación de fluorescencias se ajustaron paso a paso con células con uno o ninguno de los fluoróforos para disminuir la interferencia de las señales en las muestras con los dos fluoróforos. Se adquirieron al menos 10.000 eventos por muestra utilizando el programa *CellQuest* suministrado por el fabricante. Los resultados se analizaron con el programa *FloJo* (TreeStar, Ashland, OR, EE.UU.), tomando la población de células con características morfológicas homogéneas y transfectadas (población de células verdes expresando GFP). A la intensidad de fluorescencia en las células sin tratar con FCCP se le restó la intensidad en presencia del desacoplante para estimar el $\Delta\Psi_m$.

3.4.7. Medida de la actividad luciferasa

La actividad luciferasa se midió a partir de extractos de proteínas celulares con el kit *Luciferase Assay System*[®] (Promega). La luminiscencia se determinó en un luminómetro de placa *FLUOstar OPTIMA*[®] (BMG Labtech). La cantidad de proteína utilizada en el ensayo fue previamente titulada para que la intensidad de luminiscencia se encontrase en un tramo lineal de detección.

3.4.8. Inmunofluorescencia

La detección e imagen de la localización subcelular de IF1 utilizando los anticuerpos monoclonales generados en este estudio se registró por microscopía de inmunofluorescencia indirecta. Las células HeLa transfectadas con IF1 se crecieron sobre cubreobjetos y se trataron con *MitoTracker*[®] 200 nM (Molecular Probes) durante 20 minutos para marcar las mitocondrias. Después, se fijaron las células 20 minutos a temperatura ambiente con paraformaldehído 4% p/v, se lavaron dos veces los cubreobjetos con PBS y se incubaron 10 minutos con NaBH₄ recién preparado (1 mg/ml en PBS, pH 8) para eliminar la autofluorescencia. A continuación, se permeabilizaron las células incubando 10 minutos a temperatura ambiente con Triton X-100 al 0,1% en PBS y se bloquearon durante 10 minutos con FBS 1%, Triton X-100 0,1% en PBS. El anticuerpo monoclonal anti-IF1 se diluyó 1:100 en solución de bloqueo y se incubó con él las células durante 1 hora a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, se lavaron los cubreobjetos con PBS tres veces y se incubaron durante 1 hora en oscuridad con anticuerpo secundario de conejo anti-ratón conjugado con Alexa 555 (Molecular Probes) diluido 1:1000 en solución de bloqueo y previamente centrifugado 5 minutos a 12000 x g y 4°C. Por último, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS, una con agua y una con etanol 100% y se dejaron secar al aire. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos (con las células hacia abajo) utilizando *Mowiol-DABCO* y se secaron toda la noche en la oscuridad y a temperatura ambiente. La fluorescencia celular se registró por microscopía confocal utilizando un microscopio LSM510 (Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con un objetivo 63x1,4 Plan-Apochromat[®] (Zeiss). Los cubreobjetos para las células se prepararon de la siguiente forma: primero fueron autoclavados y después se incubaron con polilisina (10 mg/ml) durante al menos 1 hora a 37°C. Después, se lavaron tres veces con PBS y tres veces con agua y se dejaron secar bajo luz ultravioleta. Los cubreobjetos así fijados se conservaron a -20°C hasta su uso.

3.4.9. Medida del consumo de oxígeno en células

La determinación de la tasa de consumo de oxígeno se realizó con el analizador de flujo extracelular XF24 (Seahorse Bioscience, Billerica, MA). El instrumento mide en tiempo real el consumo de oxígeno así como la extrusión de protones hasta 30 mmHg de oxígeno y 0,4 unidades de pH gracias a dos biosensores fluorescentes para O₂ y para pH. Además, permite la inyección secuencial de cuatro compuestos diferentes gracias a sus cuatro inyectores por pocillo. Los biosensores del aparato se calibraron antes de cada experimento con una solución de referencia de concentración de oxígeno y pH conocido. Las células NRK y HeLa se sembraron a una densidad de 7.000

células por pocillo en placas especiales (Seahorse Bioscience) y en un volumen inicial de 100 µl de medio de crecimiento y se incubaron a 37°C y 7% CO₂. Una vez que las células se adhirieron a la placa (pasadas unas 3 horas) se añadieron 150 µl más de medio de cultivo. Éste método de plaqueo asegura una distribución de células uniforme en la pequeña superficie del pocillo (0,5 cm²). El día del experimento el medio se sustituyó por el volumen apropiado de medio de cultivo sin tamponar. Las células se dejaron en una estufa a 37°C durante un tiempo no inferior a una hora con objeto de que, tanto la temperatura como el pH, alcanzasen el equilibrio y a continuación se introdujeron en el aparato calibrado para la determinación de consumo de oxígeno. Se realizaron dos medidas consecutivas de consumo de oxígeno para cada compuesto en cada pocillo, siendo el orden y la concentración final de éstos los siguientes: 6 µM de oligomicina, 1 µM de FCCP, 1 µM de rotenona y 1 µM de antimicina (Sigma-Aldrich).

3.4.10. Inmunohistoquímica

Para las inmunohistoquímicas de **hígado de ratón**, tras 32 horas aproximadamente en PFA (sección 3.5.5) se lavó el tejido tres veces durante 10 minutos con PBS y se sumergió en una solución de sacarosa al 30 % en PBS durante 2 días como crioprotector. Después, se embebieron en *Tissue-Teck® OCT™* (*Optimal Cutting Temperature Compound*, Sakura, Alphen aan den Rijn, Países Bajos) y se hicieron cortes seriados de 20 µm con un micrótopo (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Las secciones se sumergieron en una solución de glicerol 30%, etilenglicol 30%, dH₂O 30% y tampón fosfato 10% pH 7 y se conservaron a 4°C. Para la inmunodetección de IF1, se trataron las muestras en flotación con H₂O₂ 1% en PBS para eliminar la actividad peroxidasa endógena se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon durante 1 hora en solución de bloqueo (BSA 1%, FBS 5% y Tritón X-100 0,2%). Se incubaron las secciones toda la noche con anticuerpo primario monoclonal anti-IF1 aquí descrito (Tabla 3) diluido 1:200 en solución de bloqueo. A continuación, se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario y el complejo avidina-biotina del kit *Elite Vectastin Kit®*, (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EE.UU.). La reacción cromogénica se desarrolló con diaminobencidina (*SIGMAFAST™* DAB, Sigma-Aldrich) y 0,003% de H₂O₂ durante 10 min. Finalmente, las secciones se montaron en portas, se tiñeron con hematoxilina de Mayer (Dako, Glostrup, Dinamarca) y se cubrieron con la ayuda del medio de montaje *Mountant Permafluor* (Thermo Scientific).

Las inmunohistoquímicas para detectar IF1 en el **array de tejidos humanos** *TissueFocus Cancer Survey Tissue Microarray* (sección 3.1.1) se desparafinaron y se inactivó la peroxidasa endógena incubando con H₂O₂ 3% en metanol durante 10 minutos. Se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo primario anti-IF1 aquí descrito (Tabla 3) diluido en PBS con 0,5% de BSA y, tras lavar con PBS, se utilizó con el kit *EnVision™ FLEX Mini kit High pH®* (Dako) con incubaciones de 30 minutos. La reacción cromogénica se desarrolló con diaminobencidina (Dako) durante 5 minutos, se tiñeron las secciones con hematoxilina y se cubrió el **array** con un cubreobjetos con ayuda de medio de montaje. En ambos casos, las secciones fueron visualizadas y fotografiadas con un mi-

croscopio invertido *Axiovert200*[®] (Zeiss) acoplado a una cámara CCD monocroma y color *SPOT RT Slider*[®] (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EE.UU.).

3.5. MÉTODOS EN RATONES

3.5.1. Condiciones generales de cuidado, mantenimiento y manejo de ratones

Los ratones utilizados en este estudio se mantuvieron en el Animalarios del CBMSO, en celdas estancas dotadas de ventilación y en un número apropiado al tamaño de la celda. Salvo en las condiciones particulares de experimentación detalladas más adelante, los animales dispusieron de libre acceso al agua y a una dieta estándar (23% proteínas, 5% lípidos, 40,8% glúcidos, 4% celulosa, 5,7% sales minerales, 12% agua y vitaminas). La temperatura y la humedad fueron controladas, oscilando entre los 22-24°C y el 40-50% respectivamente, así como los periodos de luz/oscuridad con ciclos de 12h/12h comenzando a las 08.00 am. La estabulación y manejo de los ratones fueron realizados por personal con la formación necesaria y siguiendo la normativa vigente y las directrices institucionales oportunas en cuanto a bienestar animal. Todos los experimentos fueron, además, aprobados por el Comité de Ética de la Investigación de la Universidad Autónoma de Madrid. Los experimentos fueron realizados con un número de réplicas por condición que minimizase el uso de animales siempre que se garantizara la validez estadística del estudio.

Los transgenes *tetO-IF1* y *tetO-H49K* fueron mantenidos en heterocigosis en las líneas fundadoras. Los transgenes transactivadores (*CMV-rtTA*, *CamkII α -tTA*, *LAP-rtTA* y *LAP-tTA*) fueron así mismo mantenidos en heterocigosis. En el caso de la línea LAP-rtTA se trabajó, además, con ratones homocigotos para obtener dobles transgénicos en mayor proporción (los animales homocigotos no presentaban ninguna patología ni defecto reproductivo). Para su mantenimiento, todas las líneas transgénicas fueron cruzadas con ratones *wt* C57BL6 para mantener los transgenes en este fondo genético.

Las muestras de biopsias de cola para el genotipaje así como el marcaje se tomaron en animales de una semana de edad aproximadamente.

Los experimentos se llevaron a cabo, según se indica, en ratones recién nacidos (0 días), ratones de 15 días o ratones adultos de 2 meses (experimentos en el modelo *Tet-Off*), 5 meses (experimentos de respiración mitocondrial y complejos respiratorios en el modelo *Tet-On*) u 8 meses (resto de experimentos en adultos). En general, y salvo que se especifique lo contrario, los experimentos que se exponen en la sección 4.3 en Resultados, se realizaron con animales ayunados 8 horas (ratones recién nacidos y de 15 días) o 12 horas (adultos).

3.5.2. Microinyección pronuclear

Unos 2 µg de cada fragmento de DNA preparado para microinyectar (sección 3.2.6) y disueltos en TE fueron entregados al Servicio de Transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología (CNB/CBMSO-CSIC/UAM) para su microinyección en embriones B6CBAF2 (fondo híbrido CBA y C57BL6). Brevemente, unos 25-150 ng de DNA diluido en tampón de microinyección (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 100 mM pH 8) fueron microinyectados en uno de los pronúcleos de embriones B6CBAF2 de 0,5 días y éstos se incubaron toda la noche en medio M16. Los embriones que sobrevivieron fueron implantados en hembras pseudogestantes B6CBAF1 (unos 25-30 de los embriones por hembra) y los ratones nacidos fueron genotipados y testados para identificar los ratones fundadores. La Figura 6 contiene un esquema del proceso.

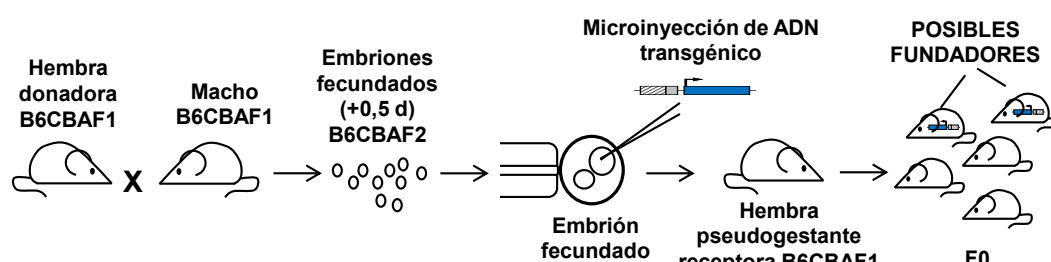


Figura 6: Esquema de la generación de ratones transgénicos *tetO-IF1* y *tetO-H49K*. Los embriones fecundados de 0,5 días (+0,5 d) se microinyectaron con el DNA transgénico y se implantaron en una hembra fundadora pseudogestante. Los ratones resultantes (F0) que contienen el DNA transgénico son posibles fundadores de colonias transgénicas.

3.5.3. Inducción de la expresión transgénica con doxiciclina

Para inducir la expresión transgénica en el modelo *On* en los experimentos de prueba de expresión de las posibles líneas fundadoras, se inyectó una solución de doxiciclina (Sigma-Aldrich) a 80 µg/g peso y 0,9% NaCl por vía intraperitoneal cada 12 horas durante 3 días. En los experimentos con ratones adultos, se les trató al menos durante una semana con una solución de doxiciclina 2 mg/ml y sacarina 0,16 mg/ml (Sigma-Aldrich) en el agua de bebida. La solución de doxiciclina se administró en botellas oscuras y se renovó una vez a la semana.

Para los experimentos de ratones con 15 días, la madre fue tratada con doxiciclina vía oral como se indica en el párrafo anterior. El día del experimento, para someter las crías a ayuno, éstas fueron separadas de la madre y tratadas con inyecciones intraperitoneales de doxiciclina cada 4 horas durante 8 horas (ver más arriba). Para los experimentos de ratones recién nacidos, se separó a las crías de la madre el día del parto y se las trató con inyecciones intraperitoneales cada 4 horas durante 8 horas (ver más arriba).

3.5.4. Inducción de carcinogénesis hepática con N-dietilnitrosamina (DEN)

La activación del N-dietilnitrosamina (DEN), y por tanto, su efecto carcinogénico, está mediada por citocromo P450, enzima especialmente activa en los hepatocitos, razón por la cual este compuesto es frecuentemente utilizado como inductor de hepatocarcinogénesis en modelos mu-

rinos (Chen y cols., 1993; Zimmers y cols., 2008; Heindryckx y cols., 2009). Teniendo en cuenta la resistencia del fondo genético C57BL6 en la generación de tumores inducidos por DEN (Diwan y cols., 1986; Drinkwater y cols., 1986) se inyectaron 25 µg/g peso de DEN en animales de 14 días de edad. Como control de tratamiento, se inyectó un volumen semejante de PBS en otros ratones. El estudio del fenotipo se realizó a los 11 meses tras la inyección.

3.5.5.Extracción y procesamiento de sangre y órganos de ratón

Se extrajeron 50 µl de **sangre** por punción en la vena mandibular que se desproteinizaron inmediatamente con 250 µl de NaOH 0,06 M. Posteriormente se neutralizaron las muestras con 250 µl de ZnSO₄ 1% p/v, se centrifugaron 5 minutos a 15.600 x g y se recogieron los sobrenadantes, con los que se determinó la concentración de glucosa (50 µl de muestra), de lactato (100 µl), de aminoácidos (80 µl) y de acilcarnitinas (80 µl) según se describe en la sección 3.3.5. Para la determinación de la concentración de transaminasas, se recogieron 200 µl de sangre en tubos *Microtainer® SST* (BD) y tras 30 minutos de coagulación a temperatura ambiente se centrifugaron los tubos 5 minutos a 1.200 x g y se recogió el sobrenadante (suero). Éste se diluyó 1:4 en suero salino y se utilizó para la determinación de transaminasas según se describe en la sección 3.3.5 (30 µl de muestra por determinación).

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los órganos de interés se extrajeron inmediatamente después. Los órganos extraídos se lavaron en PBS y se procesaron según su uso posterior. Para la extracción de proteínas se pulverizaron en mortero con N₂ líquido y se homogeneizaron y trataron con el tampón correspondiente (sección 3.3.1). Las muestras destinadas a inmunohistoquímica fueron embebidas en paraformaldehído (PFA) 4% en tampón fosfato 0,2 M de Sorensen (pH 7,2-7,3). Para la determinación de nucleótidos de adenina, y ácidos orgánicos en hígado de ratón, se extrajo, se pesó y se pulverizó el hígado en mortero con N₂ líquido y a continuación se desproteinizó el pulverizado con 5 volúmenes de ácido perclórico al 6%. Finalmente se neutralizaron los sobrenadantes en presencia de indicador universal y se utilizó el sobrenadante para las determinaciones (sección 3.3.6). Se tuvo especial cuidado con la temperatura de las muestras, manteniéndolas en hielo durante su manejo y a -70°C durante la conservación. Los nucleótidos se midieron inmediatamente para evitar la hidrólisis.

3.5.6.Aislamiento de mitocondrias de hígado de ratón

Se sacrificó el animal, se extrajo el hígado completo (sección 3.5.5) y se pesó. A continuación, se trituró, se añadieron tres volúmenes de medio A (sacarosa 250 mM, EGTA 1 mM, BSA 0,2% p/v, Tris-HCl 10 mM pH 7,4) y se homogeneizó en *potter* de vidrio (5 pases con un émbolo y 4 pases con otro émbolo más ajustado). Se centrifugó 10 minutos a 938 x g para desechar restos celulares, se decantó el sobrenadante y se volvió a centrifugar 10 minutos a 8.650 x g para precipitar las mitocondrias. El precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de medio B (sacarosa 250 mM, EGTA 0,3 mM, BSA 0,2 % p/v, Tris-HCl 1 mM pH 7,4) y se volvió a centrifugar 10 minutos a 8.650 x

g. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 200 µl de medio B. Todo el proceso se llevó a cabo en hielo y las centrifugaciones a 4°C. La cuantificación de la cantidad de mitocondrias aisladas se realizó midiendo la cantidad de proteína (sección 3.3.1) presente en una alícuota de la suspensión de mitocondrias sometida a tres ciclos de congelación/descongelación en N₂ líquido.

3.5.7. Medida del consumo de oxígeno en mitocondrias de hígado de ratón

El consumo de oxígeno de las mitocondrias aisladas de hígado de ratón se determinó usando un electrodo de oxígeno de tipo Clark empleando una cubeta de 2 ml a 30°C (Valcarce y cols., 1988). Se introdujeron una cantidad de mitocondrias correspondiente a 1 mg de proteína en la cubeta con medio de respiración (sacarosa 225 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM, BSA 0,05 % p/v, tampón fosfato-potasio 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7,4) suplementado con sustrato respiratorio (succinato 8 mM, o piruvato+malato 5 mM cada uno). Se registró la respiración basal hasta que la pendiente fuese estable y a continuación se añadió ADP 0,1 mM, OL 2 µM, FCCP 5 µM y antimicina 4 µM si el sustrato respiratorio utilizado fue succinato o rotenona 4 µM si fue piruvato+malato, registrando un tiempo suficiente entre cada compuesto. Los parámetros respiratorios medidos se expresaron como nmol de oxígeno consumidos por minuto y por mg de proteína mitocondrial.

3.5.8. Medida de la actividad citocromo c oxidasa en mitocondrias de ratón

A partir de una suspensión de mitocondrias (sección 3.5.6) se tomó una alícuota, se diluyó en medio B (sección 3.5.6) con tritón 0,1% hasta una concentración de 1 µg/µl de proteína y se sometió la muestra a tres ciclos de congelación y descongelación en N₂ para romper las membranas mitocondriales y solubilizar los complejos respiratorios. Tras una centrifugación 5 minutos, se recogió el sobrenadante con el que se lleva a cabo la determinación. Ésta se basa en la cuantificación de la velocidad de oxidación del citocromo c reducido a través del descenso en su absorbancia a una longitud de onda de 550 nm (Wharton y cols., 1974).

3.6. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software SPSS 19.0. Los resultados de este trabajo están representados en Figuras y Tablas por la media ± S.E.M del número de muestras indicado entre paréntesis.

3.6.1. Análisis de la significatividad

Se aplicó el estadístico de contraste de la *t* de Student que compara las medias de dos variables que siguen una distribución normal para determinar la significatividad estadística de los

resultados. Un $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Para comparaciones múltiples respecto a un control, se realizó además el análisis *post hoc* de Dunnett.

La distribución de marcadores moleculares y otras variables categóricas en la cohorte de adenocarcinomas de mama fue comparada por las pruebas de χ^2 y t de Student. La significatividad de las correlaciones lineales fue determinada por la prueba t de correlación de Pearson.

3.6.2. Análisis de supervivencia

Para determinar la asociación entre los niveles de expresión de IF1 con la supervivencia global (SG) y con la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en la cohorte de biopsias de adenocarcinoma humano la expresión de IF1 se cuantificó y se expresó relativa al nivel de expresión de β -actina de la misma muestra. La expresión de IF1 fue dicotomizada por el valor 0,06 de corte en baja y alta expresión. Este valor corresponde al 1,5% de la expresión máxima de IF1 en la cohorte. El valor fue seleccionado con los siguientes criterios: i) un valor de expresión cercano a 0, ya que las muestras normales de mama no tienen expresión de IF1 detectable ii) un valor tal que nos permita obtener dos grupos con un mínimo de 30% de muestras cada uno.

La relación entre la expresión de IF1 y la historia clínica de cada muestra fue analizada con el software SPSS 19.0. La supervivencia global (SG) se calculó a partir de la fecha de diagnóstico del tumor. La supervivencia libre de enfermedad (SLE) se definió como el intervalo de tiempo entre la fecha de la operación y la fecha de detección de metastasis del tumor. Las curvas de supervivencia se derivan del análisis Kaplan-Meier y la significatividad se calculó por el test de Log-Rango. Para estudiar la relación entre supervivencia, variables clínico-patológicas y expresión proteica se utilizó la regresión de Cox, tanto el modelo univariante como multivariante. La razón de proporción de riesgo o *hazard ratio* (HR) se expresa con su intervalo de confianza de 95% (95% IC) y los test estadísticos fueron de dos colas al 5% de significancia.

3.6.3. Agrupamiento jerárquico (clustering)

La expresión global de IF1 y BEC se analizó por agrupamiento jerárquico no supervisado. Para ello, los datos fueron normalizados respecto a la media del nivel de expresión del marcador en muestras normales y transformadas en el $\log(2)$. Se utilizó el programa EPCLUST (<http://ep.ebi.ac.uk/EP/EPCLUST>), utilizando las distancias Euclideas y el método de la media ponderada (*Weighted Pair-Group Method with Arithmetic mean*).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE IF1

La función de IF1 como inhibidor de la función hidrolítica de la H⁺-ATP sintasa previamente descrita (Pullman y cols., 1963; Cabezon y cols., 2003) nos llevó a preguntarnos si esta molécula sería capaz de inhibir la función ATP sintasa en condiciones fisiológicas. Sin embargo, para poder inmunodetectar adecuadamente esta proteína tuvimos que generar anticuerpos monoclonales contra ella, ya que los disponibles comercialmente carecen de la suficiente especificidad y sensibilidad.

4.1.1. Generación de anticuerpos monoclonales anti-IF1

Mediante técnicas anteriormente descritas (Sambrook y cols., 2001), se clonó el cDNA codificante de la proteína IF1 humana a partir del vector *pCMV-SPORT6-IF1* en el vector de expresión *pQE-Trisystem* que añade una cola de histidinas y estreptavidinas al extremo carboxilo terminal de la proteína (ver Materiales y Métodos sección 3.2.1 y Figura 7A). Esta construcción se transformó en bacterias, se indujo la expresión de la proteína IF1 recombinante (r-IF1) con IPTG (Figura 7B) y se purificó mediante una resina de Ni-NTA a partir del precipitado sonificado obtenido tras la lisis de las bacterias. r-IF1 fue utilizada para inmunizar ratones, a partir de los cuales se obtuvieron anticuerpos policlonales con buenas características de especificidad (Figura 7C y 8B) que son, por sí mismos, una buena herramienta. El bazo del ratón con anticuerpos policlonales de mayor especificidad y afinidad ("ratón 1") fue utilizado para obtener hibridomas de acuerdo con técnicas previamente descritas. Se obtuvieron 35 clones distintos, positivos por ELISA, de los cuales 18 reconocían tanto la proteína recombinante como la proteína nativa en tejidos humanos. El clon con mejores características de afinidad y especificidad (clon 14/2.1, Figura 7C) fue seleccionado para su expansión y producción a gran escala de anticuerpos monoclonales y es el anticuerpo anti-IF1 utilizado en este estudio salvo que se indique lo contrario. El anticuerpo monoclonal anti-IF1 tiene una gran especificidad y permite detectar la proteína nativa localizada en las mitocondrias por inmunofluorescencia (Figura 7D) así como por *western blot* en células (Figura 7C) y tejidos humanos (Figura 8C).

4.1.2. Expresión diferencial de IF1 en distintos tejidos murinos y humanos

Encontramos niveles de IF1 muy diferentes en células y en tejidos humanos y de ratón (Figura 7C y 8), sugiriendo una expresión diferencial del inhibidor según la función del tejido como ocurre con la expresión de β F1ATPasa (Izquierdo y cols., 1995). En las líneas celulares humanas se diferencian unas con una alta expresión de IF1 (HEK 293T, T-37D, HeLa) y otras con una menor expresión (A549, Hep G2, HCT 116) (Figura 7C). Las células de rata (NRK) y ratón (Hepa 1-6) no presentan inmunorreactividad contra el anticuerpo (Figura 7C) demostrando la elevada especificidad

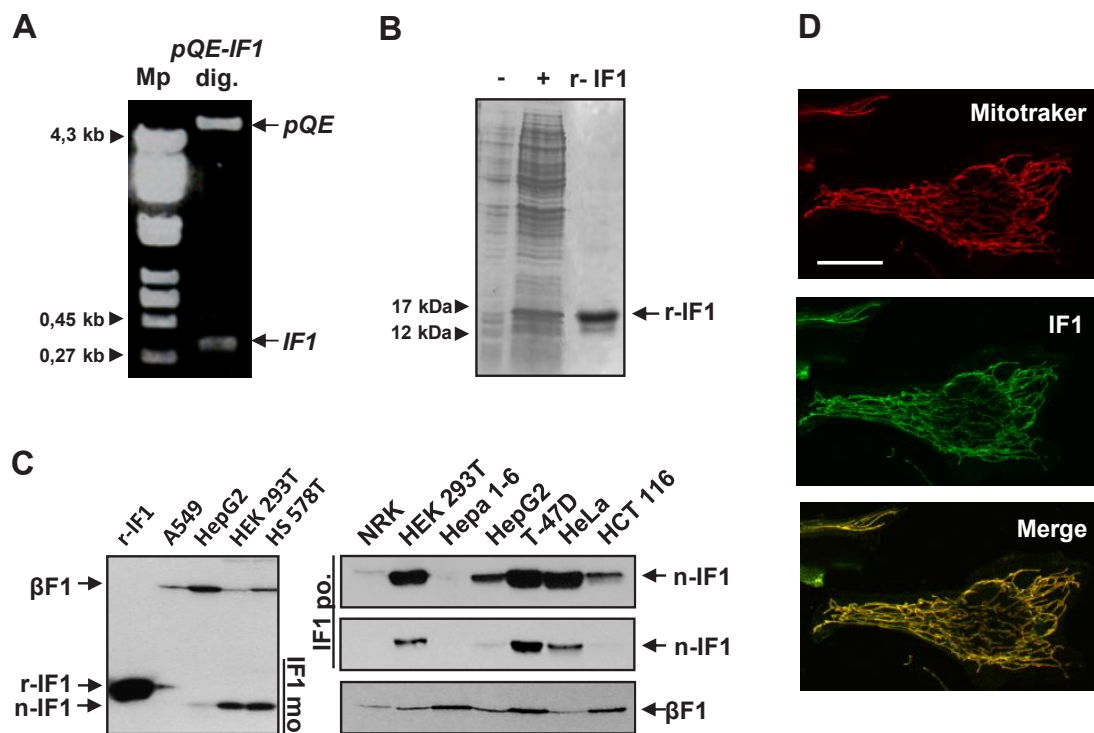


Figura 7: Generación de anticuerpos anti-IF1 a partir de la proteína IF1 recombinante. **A:** Electroforesis en gel de agarosa de la digestión del plásmido *pQE-IF1* (*pQE-IF1* dig.) con las enzimas Sac I y Not I que liberan el inserto (*IF1*, \approx 400 pb) del vector (*pQE*, \approx 6 Kb). Mp: marcador de peso molecular. El tamaño de las bandas de DNA del marcador se muestra a la izquierda. **B:** Electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y tinción Coomassie del precipitado del cultivo bacteriano inducido (+) y sin inducir (-) y de la proteína recombinante IF1 (r-IF1) purificada a partir del cultivo inducido. Los pesos moleculares aparecen indicados a la izquierda del panel. **C:** Western blot de la expresión de IF1 y de β F1-ATPasa (β F1) en distintas líneas celulares utilizando el anticuerpo anti-IF1 monoclonal (IF1 mo., panel izquierdo) o el policlonal (IF1 po., panel derecho), donde se muestran dos exposiciones diferentes para IF1. Se pueden distinguir claramente líneas con alta y baja expresión de IF1. La proteína recombinante (r-IF1) tiene un peso superior (\approx 16 kDa) a la proteína nativa (n-IF1, \approx 12 kDa) debido a la cola de histidinas y estreptavidinas (ver B). **D:** Imágenes de microscopía de inmunofluorescencia (x63) de células HeLa teñidas con MitoTracker (rojo) y con el anticuerpo monoclonal anti-IF1 (verde) que muestran la colocalización (merge) de IF1 en mitocondrias. Barra = 20 μ m.

del anticuerpo contra h-IF1. Los tejidos de ratón presentan una gran variabilidad en el contenido de IF1 (Figura 8A) detectada con el anticuerpo comercial de baja especificidad. En general, podemos discriminar tejidos murinos con elevado valor de β F1 y ausencia de expresión de IF1 como corazón o bazo (Figura 8A), tejidos con altos niveles de β F1 y de IF1 como músculo, hígado, corteza renal o cerebro (Figura 8A), y tejidos con bajo nivel de β F1 y de IF1 como pulmón, colon, esófago, estómago, intestino delgado o páncreas (Figura 8A).

El mismo estudio en tejidos humanos usando el anticuerpo policlonales (Figura 8B) o monoclonal (Figura 8C) generados en este estudio muestran que los tejidos relacionados con el tracto digestivo (hígado, estómago, colon) excepto esófago, tienen, junto con corazón y músculo, los niveles más elevados de IF1 y de β F1 (Figura 8B-C). Mama y pulmón, sin embargo, tienen bajos niveles de expresión tanto de IF1 como de β F1 (Figura 8B-C).

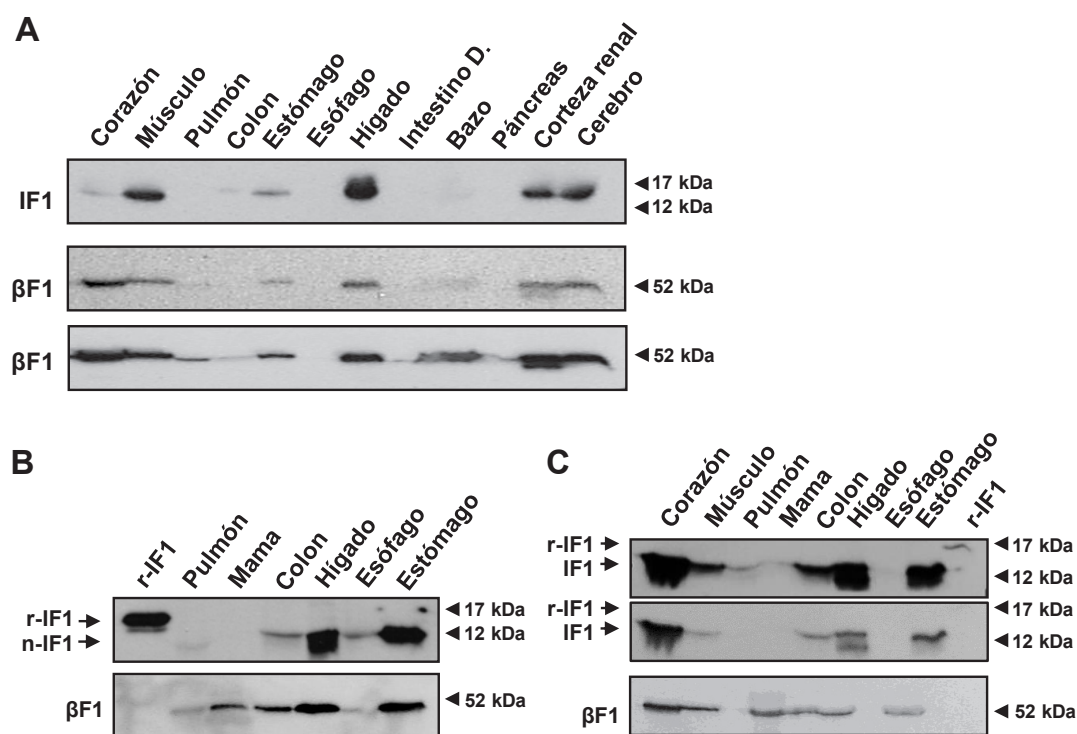


Figura 8: Niveles de expresión de IF1 y β F1 en tejidos murinos (A) y humanos (B-C). Nivel de expresión determinado por *western blot*, de IF1 y de β F1 en tejidos de ratón (A) y humanos (B-C) utilizando el anticuerpo anti-IF1 comercial (Molecular Probes, A) o el anticuerpo policlonal (B) o monoclonal (C) producidos en este estudio. Los pesos moleculares aparecen indicados a la derecha de cada panel. r-IF1: IF1 recombinante; n-IF1: IF1 nativa; Intestino D.: intestino delgado.

4.1.3. La sobreexpresión de IF1 en células de rata, ratón y humanas produce una estimulación de la glucólisis aeróbica

Según el efecto Pasteur, cuando una célula sufre un bloqueo en la producción de ATP mitocondrial su flujo glucolítico aumenta para satisfacer la demanda energética, incrementándose así el consumo de glucosa y la producción de lactato. Este aumento glucolítico puede suceder en condiciones de normoxia, por lo que recibe el nombre de glucólisis aeróbica. Con objeto de estudiar el efecto de IF1 sobre la H^+ -ATP sintasa, transfectamos transitoriamente líneas celulares con niveles bajos de IF1 (Figura 7C) con plásmido control (*pEGFP-C2-pre β*), o IF1 (*pCMV-SPORT6-IF1*) o su forma mutante (*pCMV-SPORT6-H49K*) y determinamos su flujo glucolítico (Figura 9). La forma mutante de IF1, H49K, ha sido descrita como un inhibidor de la actividad hidrolasa de la H^+ -ATP sintasa pH-independiente (Schnizer y cols., 1996; Cabezon y cols., 2000b). Las células de rata (NRK) y ratón (Hepa 1-6) presentan un flujo glucolítico significativamente mayor cuando sobre-expresan IF1 o su forma mutante H49K comparado con las células transfectadas con un plásmido control (Figura 9A-B). Este efecto es similar, aunque de menor intensidad, al obtenido cuando estas células son tratadas con oligomicina, un inhibidor de la H^+ -ATP sintasa (Figura 9A-B). En las células Hep G2, el efecto de IF1 o H49K es menos marcado que el de la oligomicina (Figura 9C) aunque estadísticamente significativo en el caso de la sobreexpresión de H49K (Figura 9C), debido, quizás, a la baja eficiencia de transfección obtenida en esta línea celular.

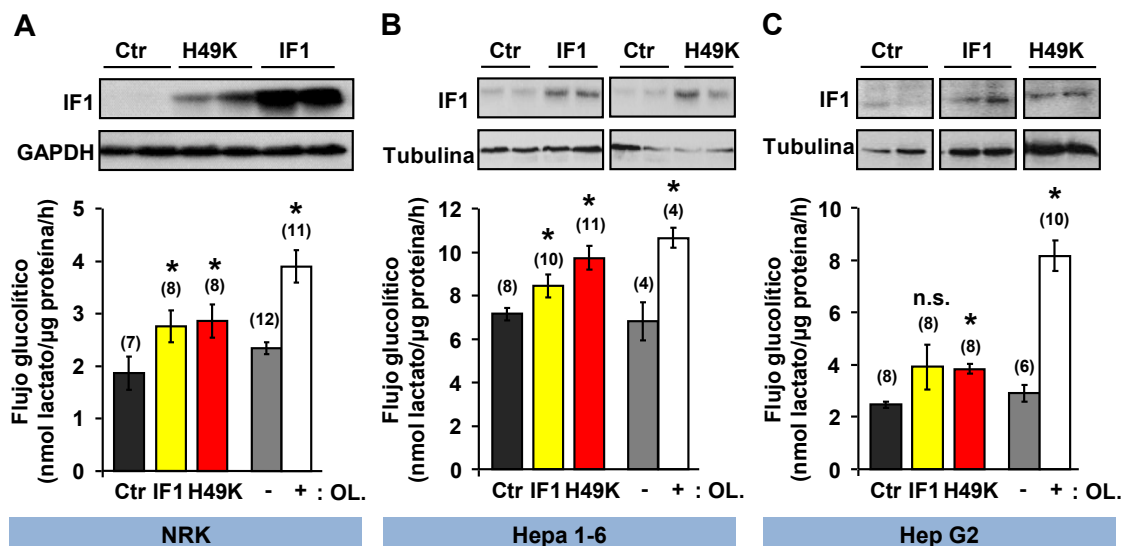


Figura 9: Efecto de IF1 y H49K en el flujo glucolítico de células de rata (A), ratón (B) y humanas (C). Ejemplos representativos de la sobreexpresión de IF1 o H49K en *western blot*. La expresión de tubulina o GAPDH se muestra como control de carga. Las células se transfectaron con un plásmido control (*pEGFP-C2-preβ*, Ctr, barras negras), IF1 (*pCMV-SPORT6-IF1*, barras amarillas) o H49K (*pCMV-SPORT6-H49K*, barras rojas) y se determinó el flujo glucolítico a las 48h. Como referencia, se muestra el efecto en el flujo glucolítico de la oligomicina (OL) (+, barras blancas) respecto a las mismas células sin tratamiento (-, barras grises). Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. *: $p < 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student y el análisis *post hoc* de Dunnet; n.s.: no significativo.

Decidimos utilizar un plásmido con promotor regulable por doxiciclina para poner de manifiesto pequeñas diferencias en flujo glucolítico que se produzcan por inhibición de la H^+ -ATP sintasa. Para ello clonamos el cDNA de IF1 o su forma mutante contenido en los plásmidos *pCMV-SPORT6-IF1* y *pCMV-SPORT6-H49K* en el plásmido *pTRE2hyg* (ver Materiales y Métodos sección 3.2.8.3) y transfectamos transitoriamente células HeLa estables para el transactivador tTA (HeLa Tet *Off Advanced*). Sin embargo, esta línea celular tiene un elevado contenido endógeno de IF1 (Figura 7C), por lo que la transfección de *pTRE2hyg-IF1* o *pTRE2hyg-H49K* no produce ningún efecto significativo en el flujo glucolítico (Figura 10).

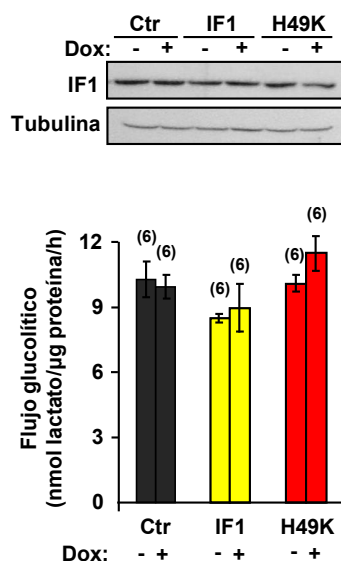


Figura 10: Falta de efecto en flujo glucolítico de IF1 o H49K en células con alto nivel endógeno de IF1. Las células HeLa Tet-Off *Advanced* se transfectaron con plásmido control (*pTRE2hyg-luc*, Ctr, barras negras), IF1 (*pTRE2hyg-IF1*, barras amarillas) o H49K (*pTRE2hyg-H49K*, barras rojas) en presencia (+) o ausencia (-) de doxiciclina (Dox). El flujo glucolítico se determinó a las 8h de retirada de doxiciclina. Se muestra un *western blot* de IF1 y GAPDH como control de carga. No se observan diferencias significativas en el flujo glucolítico aeróbico en condiciones de inducción de la expresión (Dox -) *versus* no inducción (Dox +) o *versus* control como consecuencia de la ineficacia de la sobreexpresión en esta línea de alto contenido endógeno de IF1. Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. La comparación de medias se realizó por la prueba de *t* de Student.

4.1.4. La sobreexpresión de IF1 en células de rata, ratón y humanas produce un aumento en el potencial de membrana mitocondrial.

La actividad de la H^+ -ATP sintasa determina el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Si la enzima se inhibe, la síntesis de ATP cesa, pero además se produce una hiperpolarización de la membrana interna mitocondrial. Esta hiperpolarización se debe a la interrupción de la entrada de protones producidos por la cadena respiratoria al interior de la mitocondria. De hecho, cuando cualquiera de las líneas celulares de estudio (NRK, Hepa 1-6 o Hep G2) se trata con oligomicina, el $\Delta\Psi_m$ aumenta muy significativamente (Figura 11). De igual forma, las células NRK y Hepa 1-6 sufren un hiperpolarización cuando sobre-expresan IF1 y, en mayor medida, H49K (Figura 11A-B). El mismo estudio utilizando la línea celular HepG2 Tet-On Advanced y plásmidos bidireccionales regulados por doxiciclina (*pBI-GL*, *pBI-L-IF1* y *pBI-LH49K*, ver Materiales y Métodos sección 3.2.8.2) confirma que IF1 o H49K producen un aumento significativo en $\Delta\Psi_m$ también en esta línea celular (Figura 11C).

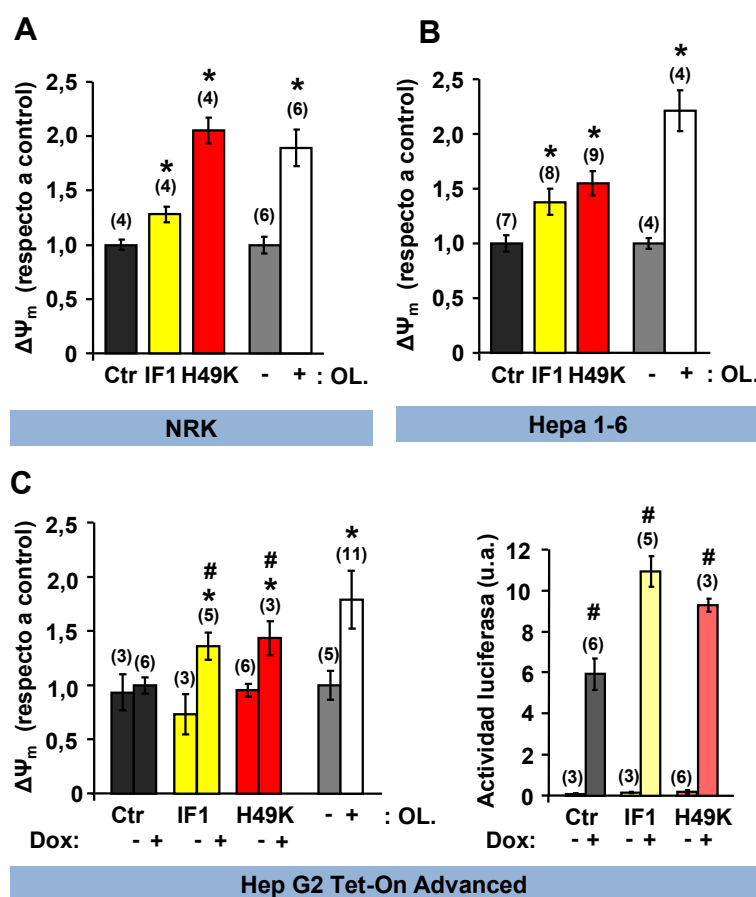


Figura 11: Efecto de IF1 y H49K en el potencial de membrana mitocondrial de células de rata (A), ratón (B) y humanas (C). A-B: Las células se transfectoron con un plásmido control (*pEGFP-C2-preβ*, Ctr, barras negras), IF1 (*pCMV-SPORT6-IF1*, barras amarillas) o H49K (*pCMV-SPORT6-H49K*, barras rojas). D: las células Hep G2 Tet-On Advanced se transfectoron con un plásmido bidireccional luciferasa-galactosidasa (*pBI-GL*, Ctr, barras negras), luciferasa-IF1 (*pBI-L-IF1*, barras amarillas) o luciferasa-H49K (*pBI-L-H49K*, barras rojas) y se indujo la expresión con (+) o sin (-) doxiciclina (Dox). A la izquierda, se muestra la inducción de la expresión medida a través de la actividad luciferasa de los extractos celulares transfectados. En todos los casos, se determinó el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) a las 48h post-transfección. Como referencia, se muestra el efecto en $\Delta\Psi_m$ de la oligomicina (OL) (+, barras blancas) respecto a las mismas células sin tratamiento (-, barras grises). Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. *: $p < 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student y el análisis *post hoc* de Dunnet; #: $p < 0,05$ cuando se compara frente a estado no inducido según la prueba *t* de Student; u.a.: unidades arbitrarias.

Sin embargo, cuando estos experimentos se llevaron a cabo con una línea celular con elevado contenido endógeno de IF1 como T-47D Tet-On (Figura 7C) usando los plásmidos regulados por doxiciclina *pTRE2hyg*, no encontramos ningún efecto significativo de IF1 o H49K en el potencial de membrana (Figura 12).

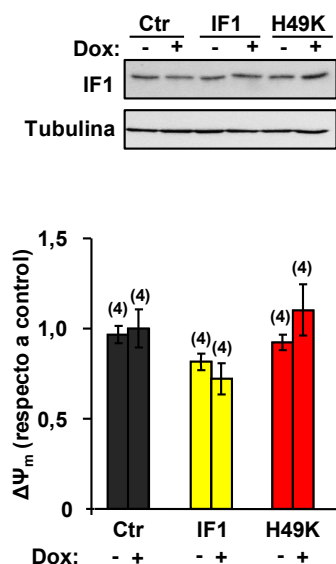


Figura 12: Falta de efecto en potencial de membrana de IF1 o H49K en células con alto nivel endógeno de IF1. Las células T-47D Tet-On se transfectaron con plásmido control (*pTRE2hyg-luc*, Ctr, barras negras), IF1 (*pTRE2hyg-IF1*, barras amarillas) o H49K (*pTRE2hyg-H49K*, barras rojas) en presencia (+) o ausencia (-) de doxiciclina (Dox). El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) se determinó a las 8h de tratamiento con doxiciclina. Se muestra un *western blot* de IF1 y tubulina como control de carga. No se observan diferencias significativas en el potencial de membrana mitocondrial en condiciones de inducción de la expresión (Dox +) versus no inducción (Dox -) o versus control como consecuencia de la ineficacia de la sobreexpresión en esta línea de alto contenido endógeno de IF1. Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. La comparación de medias se realizó por la prueba de *t* de Student.

4.1.5. La sobreexpresión de IF1 promueve la inhibición de la actividad de la H^+ -ATP sintasa.

Para tener una evidencia más directa de la inhibición de la H^+ -ATP sintasa producida por IF1, medimos el consumo de oxígeno de células NRK transfectadas transitoriamente con IF1 o H49K o plásmido control en el equipo *Seahorse*. La respiración sensible a oligomicina (RSO), es decir, la diferencia en consumo de oxígeno con y sin oligomicina, es una medida de la actividad ATP sintasa de la mitocondria. Este parámetro resultó disminuir significativamente cuando se sobre-expresaba IF1 y, especialmente, cuando se sobre-expresaba H49K (Figura 13A). Por tanto, el aumento en el flujo glucolítico producido por la sobreexpresión de IF1 o H49K se correlaciona con un menor efecto de la acción de la oligomicina debido a la inhibición previa de la H^+ -ATP sintasa por IF1 o H49K.

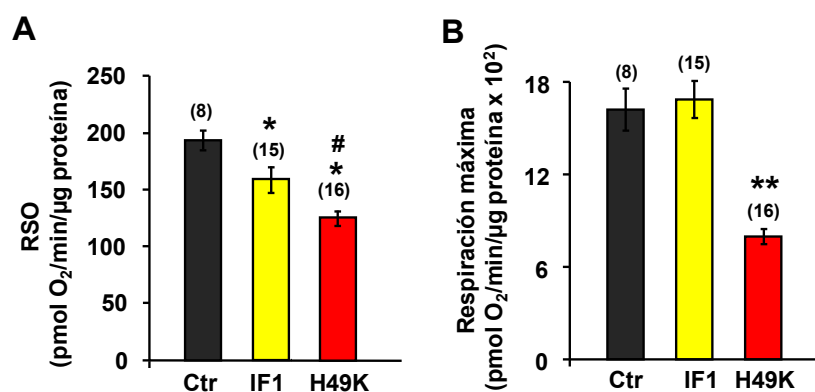


Figura 13: Efecto de IF1 y H49K en la respiración mitocondrial de células de rata (NRK). Las células NRK se transfectaron con un plásmido control (*pEGFP-C2-preβ*, Ctr, barras negras), IF1 (*pcMV-SPORT6-IF1*, barras amarillas) o H49K (*pcMV-SPORT6-H49K*, barras rojas) y a las 48 h se determinó su respiración sensible a oligomicina (RSO) (A) y respiración máxima (en presencia de FCCP) (B). Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. *: $p < 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student; **: $p < 0,01$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student; #: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a IF1 según la prueba *t* de Student.

Sorprendentemente, observamos un efecto diferencial de H49K sobre el consumo de oxígeno en presencia de FCCP. Las células transfectadas con H49K, a diferencia de las células transfectadas con IF1, no llegan a los niveles de respiración máxima de las células control (Figura 13B), lo que sugiere otro efecto adicional de H49K sobre la cadena respiratoria o sobre la viabilidad celular. El análisis microscópico de las células transfectadas con H49K no muestra más señales de muerte celular que las células transfectadas con plásmido control o IF1, tanto a nivel morfológico como en su retícula mitocondrial (marcada con GFP, datos no mostrados). El posible efecto de H49K sobre la cadena respiratoria se explora más adelante (sección 4.3.3).

4.1.6. El silenciamiento de IF1 en células humanas disminuye el flujo glucolítico aeróbico y activa la fosforilación oxidativa

Para confirmar los resultados obtenidos, silenciamos IF1 en células HeLa (Figura 14A), línea celular con un alto contenido endógeno de IF1 (Figura 7C). Como se evidenció en la Figura 10 por sobre-expresión de IF1 y H49K, esta línea celular tampoco responde con un aumento del flujo glucolítico cuando se la trata con oligomicina (Figura 14B), lo que indica la ausencia de relevancia de OXPHOS para satisfacer su demanda energética. Sin embargo, el silenciamiento de IF1 indujo una disminución muy significativa de la glucólisis aeróbica (Figura 14B), que se recupera al tratar las células con el inhibidor oligomicina (Figura 14B), demostrando la fuerte correlación entre la actividad bioenergética de la mitocondria y el flujo glucolítico celular. Por otro lado, el silenciamiento de IF1 en estas células aumenta la respiración sensible a oligomicina, lo que indica un aumento en la actividad de la H^+ -ATP sintasa (Figura 14C). Estos datos confirman, por tanto, el efecto inhibitorio de IF1 o su forma mutante H49K, sobre la función sintasa de la H^+ -ATP sintasa en células de mamífero.

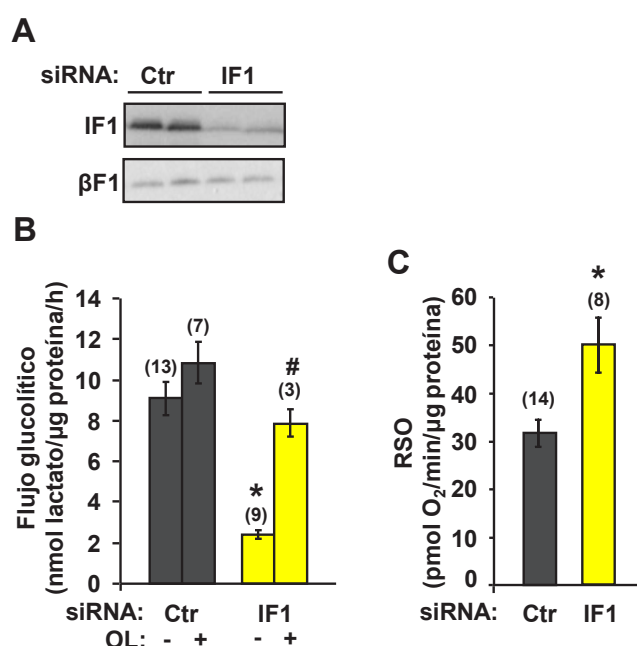


Figura 14: Efecto del silenciamiento de IF1 y H49K en el flujo glucolítico y en la actividad H^+ -ATP sintasa de células con alto nivel endógeno de IF1. Las células HeLa se transfectaron con un RNA de silenciamiento (siRNA) ineficiente como control (Ctr, barras negras) o un siRNA contra IF1 (barras amarillas) y se determinó el flujo glucolítico (B) o la respiración sensible a oligomicina (RSO) (C) a las 48 h. Ejemplo representativo del silenciamiento de IF1 en *western blot* (A) donde se muestra la expresión de $\beta F1$ ATPasa como control de carga. El efecto del tratamiento con oligomicina (OL, +) se muestra en B en las dos condiciones para comparación respecto a las células sin tratamiento (-). Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. *: $p < 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba t de Student; #: $p < 0,05$ cuando se compara frente a OL+ en células control según la prueba t de Student.

4.2. RELEVANCIA BIOLÓGICA DE IF1 EN CÁNCER

Varios estudios han descrito un aumento de la actividad de IF1 en células tumorales humanas (Chernyak y cols., 1994) y de otros orígenes (Luciakova y cols., 1984; Chernyak y cols., 1991; Bravo y cols., 2004). Esto sugiere que IF1 podría intervenir en el fenotipo bioenergético característico de la mayoría de las neoplasias humanas (Cuezva y cols., 2009; Hanahan y cols., 2011) en este caso, disminuyendo la actividad de la H⁺-ATP sintasa. Por este motivo, decidimos estudiar la expresión de IF1 en cáncer.

4.2.1. Expresión de IF1 en tumores humanos

En primer lugar, analizamos los niveles de IF1 y de β F1ATPasa en muestras tumorales y normales derivadas de dos cohortes de pacientes distintas y mediante dos técnicas diferentes.

4.2.1.1. Análisis de la expresión de IF1 en carcinomas de mama, colon y pulmón mediante western blot

Estudiamos la expresión de IF1 y de β F1ATPasa por *western blot* en muestras normales y tumorales de pacientes con adenocarcinomas de mama (Figura 15A), colon (Figura 15B), pulmón (Figura 15C) y carcinoma escamoso de pulmón (Figura 15D) obtenidos del Banco de Tumores del IDIBAPS. Sorprendentemente, un 60-100% de las muestras tumorales mostraron niveles de IF1 significativamente más elevados (entre 3 y 18 veces más expresión) que sus correspondientes muestras normales en todos los tejidos analizados (Figura 15A-D), especialmente en pulmón (Figura 15C-D).

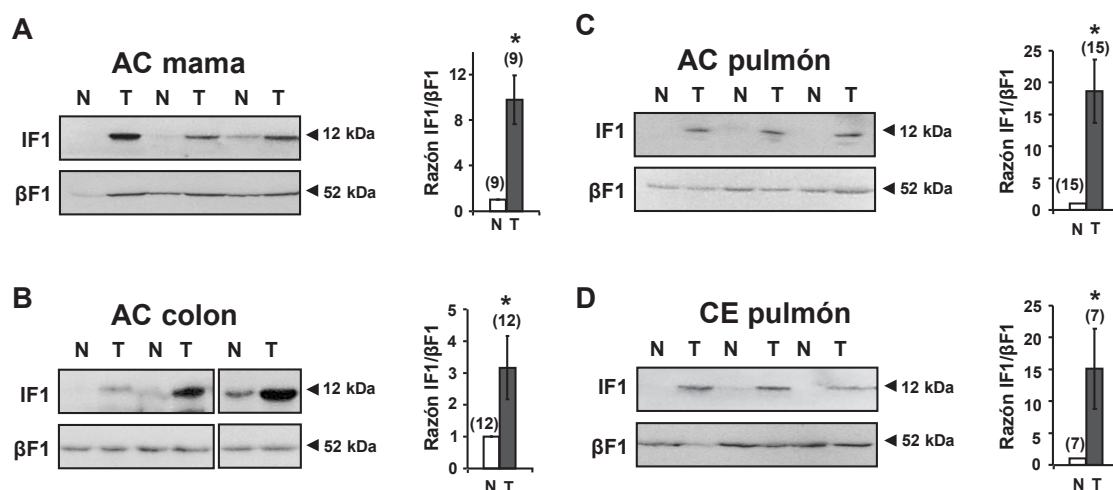


Figura 15: Expresión de IF1 en tejidos normales y tumorales por western blot. Ejemplos representativos del nivel de expresión, determinado por *western blot*, de IF1, β F1 y razón IF1/ β F1 en tejidos normales (N, barras blancas) y tumorales (T, barras negras) de pacientes con adenocarcinoma (AC) de mama (A), colon (B), pulmón (C) y carcinoma escamoso (CE) de pulmón (D). Los pesos moleculares aparecen indicados a la derecha de cada panel. Los histogramas representan la media \pm S.E.M. respecto a sus correspondientes tejidos normales del número de pacientes estudiados indicado entre paréntesis. *: p < 0,05 cuando se compara frente a tejido normal según la prueba t de Student.

4.2.1.2. Análisis de la expresión de IF1 en carcinomas de mama, colon y pulmón mediante inmunohistoquímica

Como confirmación de estos resultados, analizamos los niveles de IF1 por inmunohistoquímica en una cohorte distinta de pacientes con adenocarcinoma de mama, colon y pulmón. Las imágenes revelan igualmente un fuerte inmunomarcaje para IF1 en el 100% de las muestras tumorales no presente en las muestras normales (Figura 16). Estos hallazgos sugieren la participación, por primera vez, de IF1 en el proceso carcinogénico.

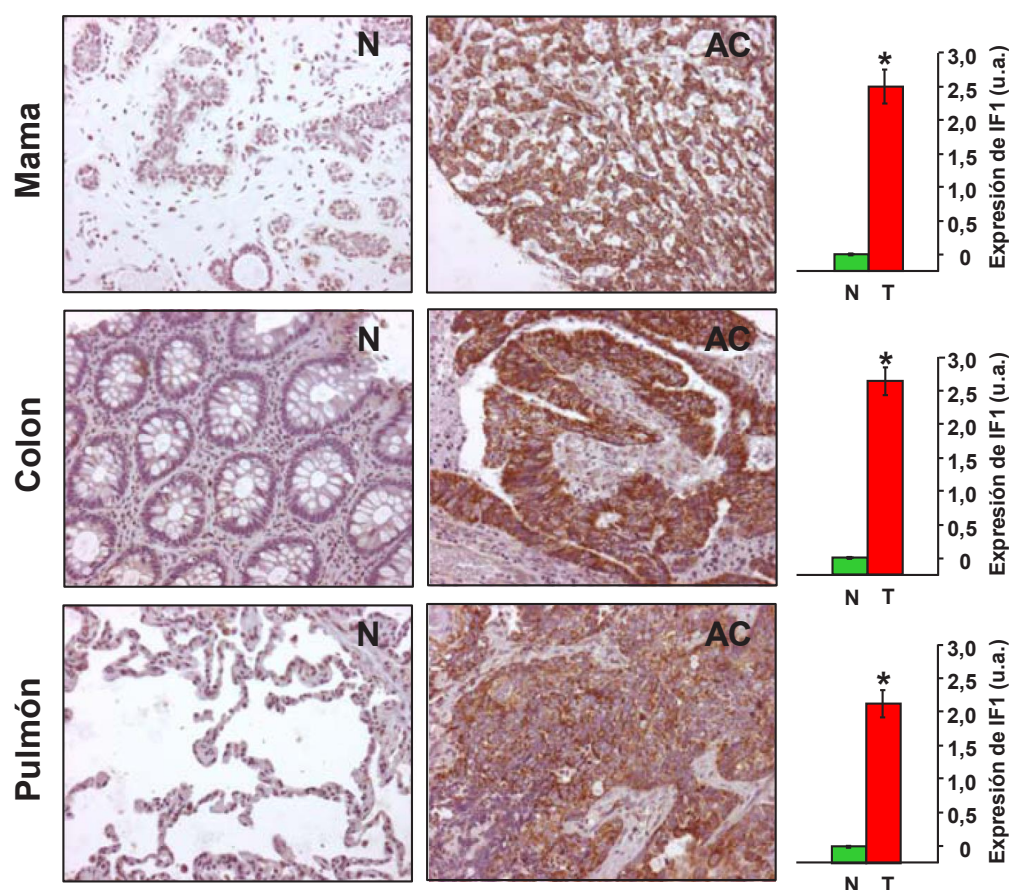


Figura 16: Expresión de IF1 en tejidos normales y tumorales humanos por inmunohistoquímica. Inmunohistoquímicas representativas de la expresión de IF1 en tejidos normales (N, izquierda) y en tejidos de pacientes (derecha) con adenocarcinoma (AC) de mama, colon, pulmón. Magnificación 20x. Los histogramas de la derecha representan la cuantificación de la expresión de IF1 en muestras normales (N, barras verdes, n=5) y tumorales (T, barras rojas, n=10).*: $p < 0,05$ cuando se compara frente a tejido normal según la prueba *t* de Student; u.a.: unidades arbitrarias.

4.2.2. **F1 como marcador de progresión tumoral en adenocarcinoma de mama**

Para tratar de dilucidar el papel que juega la sobreexpresión de IF1 en la progresión tumoral, analizamos el nivel de expresión de este inhibidor en una cohorte de 93 pacientes de adenocarcinoma infiltrante de mama de los que se dispone de las historias clínicas (Isidoro y cols., 2005; Ortega y cols., 2008). La cuantificación de esta y otras proteínas en las muestras se realizó por *western blot*, normalizando por la cantidad de proteína presente en 25 μ g de extracto celular de la línea Hs 578T cargado en cada gel como control entre distintos experimentos.

La Tabla 5 contiene un resumen de las características clínico-patológicas, índice Bioenergético Celular (BEC) (Isidoro y cols., 2005)] y expresión de IF1 en las 93 muestras tumorales analizadas. Se observa un incremento significativo en la expresión de IF1 en algunas características clínico-patológicas de mal pronóstico, como la histología lobulillar, el tamaño del tumor o la presencia de receptores hormonales (Tabla 5). Además, se observa un incremento significativo en la expresión de IF1 en tumores con una desviación en su huella bioenergética media o alta respecto de muestras normales (Tabla 5). En este sentido, existe una correlación inversa entre la expresión de IF1 y los índices bioenergéticos β F1/hsp60 ($R=-0,25$, $p=0,02$) y BEC ($R=-0,21$, $p=0,04$). Es decir, los tumores con índice β F1/hsp60 o BEC más bajo (fenotipo más glucolítico), tienen una expresión de IF1 aumentada, por lo que IF1 puede estar participando en el cambio hacia el fenotipo glucolítico observado en estos tumores. Sin embargo, es interesante destacar que la expresión de IF1 no correlaciona con ningún marcador clínico-patológico (Tabla A1 en Anexo I).

La clasificación de las muestras en función de su nivel de IF1 nos permite discriminar dos grupos de carcinomas con una significativa divergencia en los parámetros bioenergéticos β F1/hsp60 y BEC (Figura 17A). El grupo con un contenido alto en IF1 presenta un índice β F1/hsp60 y BEC significativamente menor al grupo con menor contenido de IF1 (Figura 17A).

Este patrón coincide con el encontrado para otro marcador descrito recientemente, HuR, (Ortega y cols., 2008). De hecho, IF1 correlaciona con esta proteína de unión al mRNA de β F1ATPasa ($R=0,31$, $p=0,001$) y los grupos de baja y alta expresión de IF1 muestran también diferencias significativas a nivel de este marcador pronóstico independiente (Figura 17A).

Tabla 5: Resumen de las características clínico-patológicas, índice bioenergético (BEC) y nivel de expresión de IF1 en la cohorte de pacientes de adenocarcinoma de mama estudiados. Expresión de IF1 en cada subgrupo de pacientes estratificados representada como la media \pm S.E.M. En negrita, los valores significativamente alterados ($p < 0,05$) respecto al primer subgrupo según la prueba T para muestras independientes. N: número de pacientes en cada grupo; %: porcentaje de pacientes en cada grupo; Desv. BEC: grado de alteración de la huella bioenergética respecto a las muestras normales (Isidoro y cols., 2005).

Parámetros	N	%	IF1	Parámetros	N	%	IF1
Clínico-patológicos				Estadio			
Edad				I	17	18	1,28 \pm 0,36
<50	33	35	0,77 \pm 0,19	II	54	58	0,72 \pm 0,15
>50	60	65	0,83 \pm 0,15	III	22	24	0,68 \pm 0,18
Histología				Grado			
Ductal	79	85	0,88 \pm 0,13	N/R	14	15	0,25 \pm 0,07
Lobulillar	9	10	0,19 \pm 0,06	1	8	9	1,24 \pm 0,56
Otros	5	5	0,78 \pm 0,39	2	28	30	0,91 \pm 0,26
Nº de nódulos				3	43	46	0,85 \pm 0,16
0	45	48	0,88 \pm 0,19	Receptor Hormonal			
1-3	30	32	0,73 \pm 0,19	Negativo	18	19	0,38 \pm 0,09
>3	18	19	0,75 \pm 0,22	Positivo	75	81	0,91 \pm 0,14
Tamaño				Moleculares			
<20mm	29	31	1,07 \pm 0,27	Desv. BEC			
>20mm	64	69	0,69 \pm 0,12	Baja	28	30	0,17 \pm 0,06
				Media	23	25	1,06 \pm 0,30
				Alta	42	45	1,10 \pm 0,18

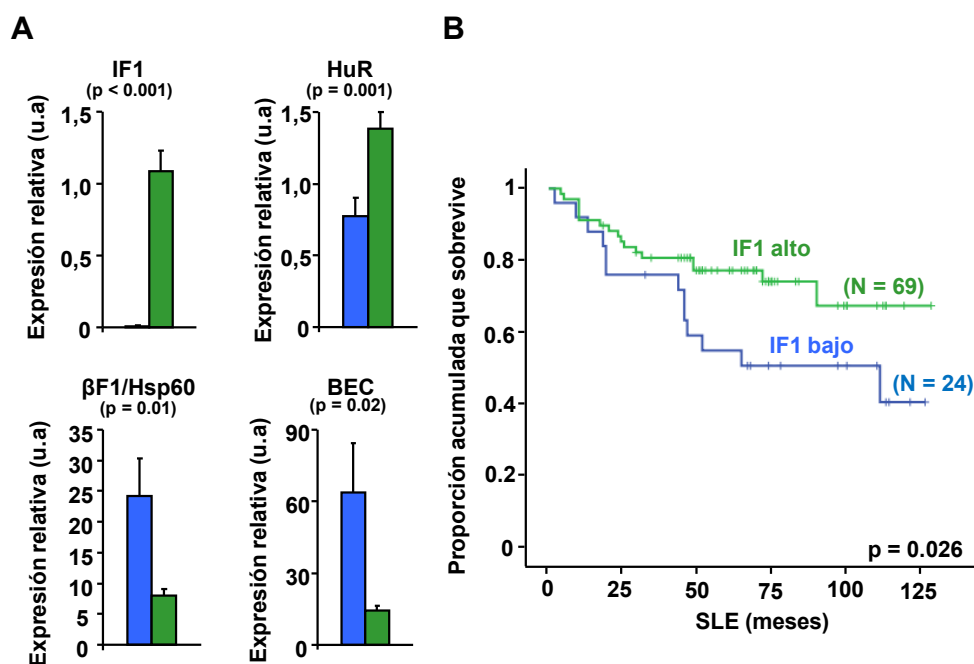


Figura 17: Niveles de distintos marcadores moleculares y supervivencia libre de enfermedad en pacientes con baja y alta expresión de IF1. A: Expresión de IF1, HuR e índices bioenergéticos βF1/Hsp60 y BEC en 93 tumores de mama estratificados según el nivel de IF1. La estratificación de los pacientes en dos grupos de alta (barras verdes) o baja (barras azules) expresión de IF1 se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos (sección 3.6.2). Los histogramas muestran la media \pm S.E.M. de los valores de expresión en cada grupo. El número de pacientes en cada grupo aparece indicado entre paréntesis en B. La comparación de las medias de la expresión de los distintos marcadores en ambos grupos se analizó mediante la prueba *t* de Student y el p-valor de cada análisis se muestra sobre el histograma correspondiente. B: Análisis univariante de Kaplan-Meier de la supervivencia libre enfermedad (SLE) de pacientes con tumores de mama estratificados por el nivel de expresión de IF1. Eje de ordenadas: proporción acumulada de pacientes que no han desarrollado metástasis en cada grupo. Eje de abscisas: tiempo de seguimiento, en meses, tras la operación. N: número de pacientes en cada grupo; p: p-valor cuando se comparan los dos grupos mediante la prueba Log-Rango.

Sorprendentemente, el análisis de la supervivencia por Kaplan-Meier en estas muestras (Figura 17B) revela que los pacientes con baja expresión de IF1 tienen una mayor probabilidad de recidiva que aquellos con alta expresión (Figura 17B y ver Tabla 6). Así, IF1 se comportaría como otros parámetros clínico-patológicos (afectación ganglionar, estadio y grado de diferenciación) que han demostrado ser variables clínico-patológicas significativamente asociadas a la progresión y supervivencia de la enfermedad [ver Tabla 6 y (Isidoro y cols., 2005; Ortega y cols., 2008)].

El análisis de Cox univariante de la supervivencia (Tabla 6) revela, que una baja expresión de IF1 está asociada a un riesgo dos veces mayor de metástasis ($HR=2,24$. $IC= 1,10-4,63$. $p=0,03$), enfatizando que una baja expresión de IF1 está asociada a la progresión tumoral.

Es interesante destacar que, la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años en pacientes con marcadores de bajo riesgo tanto clínico-patológicos (bajo número de nódulos y estadios iniciales de la enfermedad) como bioenergéticos (BEC elevado, HuR bajo) se reduce significativamente cuando la expresión de IF1 es baja (Tabla 7). Igualmente, la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años en pacientes con marcadores de alto riesgo tanto clínico-patológicos (grado avanzado de la enfermedad, tumores negativos a receptores hormonales) como bioenergéticos (alta o media+alta desviación BEC respecto a muestras normales) se reduce significativamente cuando la

expresión de IF1 es baja (Tabla 7). Algo similar se observa cuando se analiza la supervivencia global de los pacientes (Tabla 8). Es decir, un nivel bajo de IF1 se relaciona con una menor supervivencia global y libre de enfermedad, tanto en pacientes con buen pronóstico como en pacientes con peor pronóstico.

Tabla 6: Análisis univariante de la supervivencia en la cohorte de pacientes de adenocarcinoma de mama estudiados. Se analizó la supervivencia global (SG, A) y libre de enfermedad (SLE, B) de las pacientes mediante el análisis univariante de Kaplan-Meier y mediante regresión de Cox utilizando parámetros clínico-patológicos (Isidoro y cols., 2005) o moleculares. La baja y alta expresión tumoral de IF1 se realizó tal y como se describe en Materiales y Métodos (sección 3.6.2). N: número de pacientes en cada grupo. %: porcentaje de pacientes en cada grupo. Eventos: número de pacientes que mueren o con recurrencia de la enfermedad en cada grupo. SG 5 años/SLE 5 años: proporción acumulada de pacientes a los 5 años, con su error estándar (SEM) e intervalo de confianza al 95% (95% IC). El valor p fue determinado por la prueba Log-Rango respecto al primer subgrupo. HR: *hazard ratio* o proporción de riesgo del parámetro con el intervalo de confianza al 95% (95% IC). El valor p' fue determinado por el test de Wald respecto al primer subgrupo.

A

Supervivencia global (SG)

Parámetros	N	%	Eventos	Kaplan Meier				Cox							
				SG 5 años (proporción)	SEM	95% IC	p	HR (95% IC)	p'						
Clínico-patológicos															
Nº de nódulos															
0	50	50	3							0,96	0,03	0,90 - 1,02	0,001	1	
1 a 3	32	32	6							0,87	0,06	0,75 - 0,99		3,51 (0,88-14,06)	0,076
>3	19	19	8	0,61	0,12	0,37 - 0,84		8,50 (2,26-38,00)	0,002						
Estadio															
I y II	78	77	8							0,92	0,03	0,86 - 0,98	0,001		
III	23	23	9							0,67	0,10	0,46 - 0,88		97105,70 (0,00-∞)	0,906
Grado															
1 a 3	38	10	1							0,97	0,03	0,92 - 1,03	0,001	1	
3	48	56	15							0,74	0,07	0,61 - 0,87		13,65 (2,77-246,89)	0,011
Moleculares															
IF1															
Bajo	24	26	7							0,79	0,08	0,63 - 0,95	0,14	1	
Alto	69	74	9							0,89	0,04	0,81 - 0,97		2,07 (0,78-5,59)	0,151

B

Supervivencia libre de enfermedad (SLE)

Parámetros	N	%	Eventos	Kaplan Meier				Cox	
				SLE 5 años (proporción)	SEM	95% IC	p	HR (95% IC)	P'
Clínico-patológicos									
Nº de nódulos									
0	50	50	8	0,85	0,05	0,74 - 0,95	0,001	1	
1 a 3	32	32	12	0,65	0,09	0,48 - 0,82		2,76 (1,13-6,76)	0,03
>3	19	19	11	0,51	0,12	0,28 - 0,74		5,16 (2,07-12,88)	0,000
Estadio									
I	21	21	2	0,95	0,05	0,85 - 1,05	0,001	1	
II	57	56	16	0,72	0,06	0,60 - 0,84		3,51 (0,81-15,29)	0,09
III	23	23	13	0,51	0,11	0,31 - 0,72		9,06 (2,04-40,26)	0,004
Grado									
1 a 3	38	10	7	0,86	0,57	-0,28 - 2,00	0,01	1	
3	48	56	20	0,62	0,07	0,47 - 0,76		2,88 (1,21-6,81)	0,02
Moleculares									
IF1									
Bajo	24	26	13	0,53	0,10	0,33 - 0,73	0,03	1	
Alto	69	74	17	0,78	0,05	0,68 - 0,88		2,24 (1,10-4,63)	0,03

Tabla 7: Análisis de Kaplan-Meier univariante de la supervivencia libre de enfermedad de los pacientes estratificados por la expresión tumoral de IF1. Se analizó la supervivencia libre de enfermedad (SLE) de las pacientes de cáncer de mama con marcadores clínico-patológicos o moleculares de buen (verde) o mal (rojo) pronóstico (Isidoro y cols., 2005, Ortega y cols., 2008) en función de su expresión de IF1. Ésta fue dicotomizada tal y como se describe en Materiales y Métodos (sección 3.6.2). Receptor hormonal -: receptor hormonal negativo; Desv. BEC: grado de alteración de la huella bioenergética respecto a las muestras normales (Isidoro y cols., 2005); HuR bajo: expresión de HuR baja de acuerdo con la dicotomización en Ortega y cols., 2008; N: número de pacientes en cada grupo; %: porcentaje de pacientes en cada grupo; Eventos: número de pacientes con recurrencia de la enfermedad en cada grupo; SLE 5 años: proporción acumulada de pacientes que sobreviven sin enfermedad a los 5 años, con su error estándar (SEM) e intervalo de confianza al 95% (95% IC); p: p-valor cuando se comparan los dos grupos mediante la prueba Log-Rango.

Parámetros	IF1	N	%	Eventos	SLE 5 años (proporción)	SEM	95% IC	p
Clínico-patológicos								
0-3 Nódulos	Bajo	18	24	9	0,54	0,12	0,30 - 0,78	0,027
	Alto	57	76	11	0,82	0,05	0,72 - 0,92	
Estadio I + II	Bajo	17	23,94	9	0,51	0,13	0,25 - 0,77	0,007
	Alto	54	76,06	9	0,84	0,05	0,74 - 0,94	
Receptor hormonal -	Bajo	4	22,22	3	0,25	0,22	-0,19 - 0,69	0,012
	Alto	14	77,78	3	0,79	0,11	0,57 - 1,01	
Grado 3	Bajo	9	20,93	7	0,22	0,14	-0,06 - 0,50	0,014
	Alto	34	79,07	12	0,70	0,08	0,54 - 0,86	
Bioenergéticos								
BEC alto	Bajo	21	27,63	11	0,51	0,11	0,28 - 0,73	0,009
	Alto	55	72,37	11	0,808	0,055	0,698 - 0,918	
HuR bajo	Bajo	14	45,16	10	0,397	0,136	0,13 - 0,67	0,037
	Alto	17	54,84	4	0,731	0,117	0,497 - 0,965	
Desv. BEC Alta	Bajo	3	7,143	3	0,33	0,27	-0,21 - 0,88	0,018
	Alto	39	92,86	10	0,79	0,07	0,66 - 0,92	
Desv. BEC Media + Alta	Bajo	8	12,31	6	0,38	0,17	0,03 - 0,72	0,005
	Alto	57	87,69	14	0,78	0,06	0,67 - 0,90	

Tabla 8: Análisis de Kaplan-Meier univariante de la supervivencia global de los pacientes estratificados por la expresión tumoral de IF1. Se analizó la supervivencia global (SG) de las pacientes de cáncer de mama con marcadores clínico-patológicos o bioenergéticos de buen (verde) o mal (rojo) pronóstico (Isidoro y cols., 2005) en función de su expresión de IF1. Ésta fue dicotomizada tal y como se describe en Materiales y Métodos (sección 3.6.2). Receptor hormonal -: receptor hormonal negativo; Desv. BEC: grado de alteración de la huella bioenergética respecto a las muestras normales (Isidoro y cols., 2005); N: número de pacientes en cada grupo; %: porcentaje de pacientes en cada grupo; Eventos: número de pacientes que mueren en cada grupo; SG 5 años: proporción acumulada de pacientes que sobreviven a los 5 años, con su error estándar (SEM) e intervalo de confianza al 95% (95% IC); p: p-valor cuando se comparan los dos grupos mediante la prueba Log-Rango.

Parámetros	IF1	N	%	Eventos	SG 5 años (proporción)	SEM	95% IC			p
Clínico-patológicos										
0-3 Nódulos	Bajo	18	24	5	0,83	0,09	0,65	-	1,01	0,041
	Alto	57	76	4	0,95	0,03	0,89	-	1,01	
Estadio I + II	Bajo	17	23,94	5	0,82	0,10	0,62	-	1,02	0,011
	Alto	54	76,06	3	0,94	0,03	0,88	-	1,00	
Receptor hormonal -	Bajo	4	22,22	3	0,25	0,22	-0,19	-	0,69	0,001
	Alto	14	77,78	1	0,92	0,07	0,78	-	1,06	
Grado 3	Bajo	9	20,93	6	0,44	0,17	0,10	-	0,78	0,013
	Alto	34	79,07	8	0,82	0,07	0,68	-	0,96	
Bioenergéticos										
BEC alto	Bajo	21	27,63	6	0,81	0,09	0,63	-	0,98	0,012
	Alto	55	72,37	3	0,96	0,038	0,884	-	1,036	
Desv. BEC Alta	Bajo	3	7,143	2	0,33	0,27	-0,21	-	0,88	0,044
	Alto	39	92,86	7	0,84	0,06	0,73	-	0,96	
Desv. BEC Media + Alta	Bajo	8	12,31	4	0,50	0,18	0,15	-	0,85	0,01
	Alto	57	87,69	8	0,87	0,05	0,78	-	0,96	

Para confirmar la relación existente entre el nivel de expresión de IF1 y el pronóstico en pacientes de cáncer de mama, analizamos la expresión individual de cada muestra por agrupamiento jerárquico no supervisado según el nivel de expresión de IF1 y del índice bioenergético BEC (Figura 18). Este tipo de análisis permite discriminar dos grupos de pacientes, C1 y C2 (Figura 18A). El grupo C1 está caracterizado por una elevada expresión de IF1 y un elevado índice BEC, mientras que el grupo C2 tiene una expresión de IF1 y un BEC menor (Figura 18A y B). El análisis muestra que en el grupo C2 hay una mayor proporción de pacientes que han desarrollado metástasis que en el grupo C1 ($\approx 50\%$ y 30% respectivamente, ver asteriscos en Figura 18A). El análisis de Kaplan-Meier confirma que la supervivencia libre de enfermedad es significativamente menor en pacientes del grupo C2 que en pacientes del grupo C1 (Figura 18C).

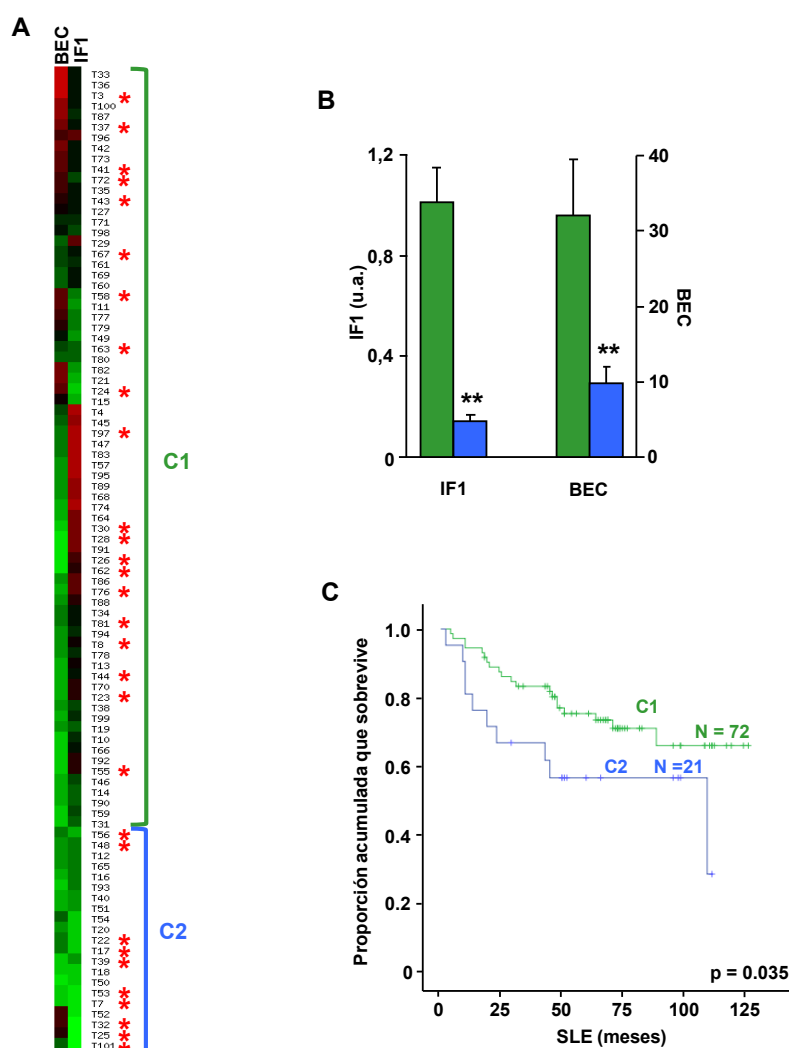


Figura 18: Agrupamiento jerárquico no supervisado de IF1 y del índice bioenergético celular (BEC). A: Representación del agrupamiento jerárquico no supervisado de IF1 y BEC (β F1ATPasa/Hsp60/GAPDH) de las 93 muestras de cáncer de mama. Filas: muestras. Columnas: marcadores moleculares. Escala de color: rojo=alto, negro=medio, verde=bajo. El dendrograma representa las similitudes globales en los perfiles de expresión, discriminando dos agrupamientos, C1 y C2, que difieren en la expresión de IF1 y de BEC. Los asteriscos señalan las muestras de pacientes que han desarrollado metástasis. B: El histograma representa la media \pm S.E.M. del valor de expresión de IF1 y el BEC en las muestras de los grupos C1 y C2. **: $p < 0,01$ cuando se compara frente a C1 según la prueba t de Student. C: Análisis univariante de Kaplan-Meier de la supervivencia libre enfermedad (SLE) de pacientes en los grupos C1 (verde) y C2 (azul). Eje de ordenadas: proporción acumulada de pacientes que no han desarrollado metástasis en cada grupo. Eje de abscisas: tiempo de seguimiento, en meses, tras la operación. N: número de pacientes en cada grupo; p: p-valor cuando se comparan los dos grupos mediante la prueba Log-Rango.

Por otro lado, estudios previos en esta cohorte de pacientes indican que existen parámetros moleculares relacionados con el metabolismo bioenergético, además de los citados parámetros clínico-patológicos, que se relacionan con la supervivencia de los pacientes y son, en sí mismos, marcadores pronóstico independientes. Entre ellos, GAPDH (Isidoro y cols., 2005), un subgrupo de pacientes con una anormalmente alta expresión de β F1ATPasa (β -cluster) (Isidoro y cols., 2005) y HuR (Ortega y cols., 2008). Para analizar si IF1 se trata de un nuevo marcador pronóstico independiente, analizamos la supervivencia libre de enfermedad por regresión de Cox multivariante (Tabla 9) considerando los parámetros significativamente asociados a la supervivencia libre de enfermedad en el análisis univariante (Tabla 6). Puesto que el número de nódulos, estadio clínico y grado histológico no son variables independientes (Isidoro y cols., 2005; Ortega y cols., 2008), sólo una de estas variables se introdujo en el análisis junto con IF1 y otro parámetro molecular. El análisis muestra que IF1 es un marcador pronóstico independiente en supervivencia libre de enfermedad cuando se analiza su expresión junto con el número de nódulos y GAPDH (Tabla 9). Un resultado semejante, muy próximo al límite de significatividad, se obtiene cuando el análisis incluye la variable clínica estadio en lugar de número de nódulos o cuando el análisis incluye el número de nódulos y β -cluster (Tabla 9).

En conclusión, estos resultados demuestran que, si bien la sobreexpresión de IF1 parece suceder de forma genérica en los tumores de mama respecto a las muestras normales (Figuras 15 y 16), una menor expresión tumoral de IF1 predice un riesgo mayor de recurrencia de la enfermedad. IF1 puede ser utilizado, por tanto, como un nuevo marcador pronóstico en cáncer de mama.

Tabla 9: Análisis multivariante por regresión de Cox de la supervivencia libre de enfermedad. Se muestra el análisis efectuado sobre distintos parámetros clínico-patológicos en combinación con parámetros moleculares significativamente ligados a la supervivencia libre de enfermedad (SLE) en el análisis univariante (Tabla 2). La estratificación de las variables moleculares en baja y alta expresión se hizo en función del punto de corte correspondiente (ver Isidoro y cols., 2005 para β -cluster y GAPDH, Ortega y cols., 2008 para HuR y sección 3.6.2 de este estudio para IF1). β -cluster-C2: grupo de muestras con una anormalmente alta expresión de β F1ATPasa y peor pronóstico clínico (Isidoro y cols., 2005); N: número de pacientes; HR: *hazard ratio* o proporción de riesgo del parámetro con el intervalo de confianza al 95% (95% IC). El valor p fue determinado por el test de Wald.

SLE			SLE		
Parámetros	HR (95% CI)	p	Parámetros	HR (95% CI)	p
Clínico-patológicos			IF1 bajo	2,19 (0,91-5,27)	0,08
IF1 bajo	1.94 (0.93-4.06)	0,08	GAPDH alto	2,39 (1,02-5,58)	0,04
1-3 nódulos	2.58 (1.05-6.32)	0,04	HuR bajo	2,50 (1,00-6,269)	0,05
>3 nódulos	3.97 (1.55-10.18)	0,004	IF1 bajo	2.19 (1.06-4.59)	0,04
IF1 bajo	1,79 (0,85-3,75)	0,13	GAPDH alto	1.90 (0.92-3.93)	0,08
Estadio III	5.94 (1.30-27.18)	0,02	β -cluster-C2	2.50 (1.14-5.48)	0,02
IF1 bajo	2.95 (1.40-6.29)	0,01	Moleculares y clínico-patológicos		
Grado 3	2,12 (0,71-6,35)	0,18	IF1 bajo	2.00 (0.95-4.18)	0,07
Moleculares			β -cluster-C2	2.60 (1.18-5.71)	0,02
IF1 bajo	2.17 (1.03-4.58)	0,04	>3 nódulos	4.79 (1.87-12.29)	0,001
β -cluster-C2	2.40 (1.08-5.28)	0,03	IF1 bajo	2.15 (1.03-4.51)	0,04
IF1 bajo	2.45 (1.19-5.05)	0,03	GAPDH alto	2.17 (1.02-4.62)	0,04
GAPDH alto	2.14 (1.04-4.42)	0,06	>3 nódulos	4.33 (1.69-11.08)	0,002
			IF1 bajo	2,02 (0,96-4,26)	0,07
			GAPDH alto	2,26 (1,07-4,76)	0,03
			Estadio III	6,16 (1,36-27,88)	0,02

4.3. MODELO ANIMAL DE INTERFERENCIA CON LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

Dado el papel de IF1 como regulador metabólico celular y marcador pronóstico en cáncer de mama, decidimos desarrollar un modelo animal de interferencia con la fosforilación oxidativa mediante la sobreexpresión de IF1 humano o su forma mutante H49K. Se eligió un modelo de expresión condicional ya que se previó que el bloqueo de la β F1ATPasa podría ser letal durante el desarrollo. Además, nos interesaba un sistema que nos permitiese expresar IF1 sólo en determinados órganos, para simular un modelo de enfermedad lo más cercano a la realidad posible. El sistema utilizado para ello fue el sistema Tet, que permite una expresión tejido-específica y al mismo tiempo regulada por doxiciclina. Para la obtención del modelo es necesaria una línea transgénica que contiene el transactivador (tTA o rtTA) bajo un promotor tejido-específico y una línea transgénica con el transgén IF1 o H49K bajo un promotor sensible a tetraciclinas. Existen comercialmente varias líneas que expresan el transactivador bajo distintos promotores específicos de tejido (líneas transactivadoras). Las líneas transgénicas que contienen IF1 o H49K (*tetO-IF1* o *tetO-H49K*), sin embargo, fue necesario generarlas.

4.3.1. Generación de ratones transgénicos *tetO-IF1* y *tetO-H49K*

Los ratones transgénicos que contienen el transgén humano IF1 o H49K bajo un promotor inducible por doxiciclina (llamados aquí *tetO-IF1* y *tetO-H49K* de forma abreviada) fueron generados por microinyección pronuclear en el Servicio de Transgénesis del Centro Nacional de Biotecnología (CNB/CBMSO-CSIC/UAM) a partir de una secuencia de DNA purificada proporcionada por nuestro laboratorio (ver Materiales y Métodos secciones 3.2.6 y 3.5.2). La Figura 19 muestra un esquema de las construcciones y la secuencia de nucleótidos se puede consultar en la Figura A2 del Anexo I.

En la microinyección pronuclear la construcción de DNA es inoculada en un pronúcleo de un embrión en estadio de una célula, integrándose ésta al azar en el genoma del embrión para dar lugar a un ratón transgénico fundador. Es una técnica ampliamente utilizada para generar ratones transgénicos por la sencillez de la construcción génica necesaria y por la rapidez en la obtención de fundadores. Sin embargo, una de sus principales desventajas es su baja eficiencia. Se estima que sólo el 1-3% de los embriones microinyectados da lugar a ratones fundadores (Wall, 2001). El proceso conlleva pérdidas de eficiencia sucesivas difícilmente evitables (Tabla 10). De los embriones

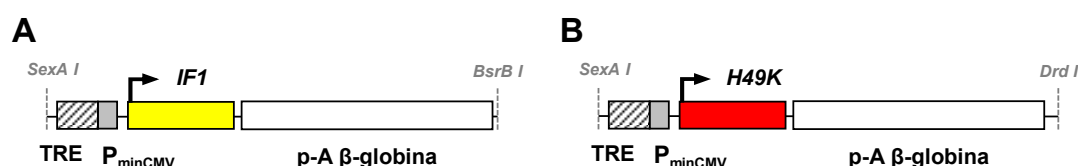


Figura 19: Esquema de los fragmentos genéticos microinyectados de IF1 (A) y H49K (B) para generar los ratones transgénicos *tetO-IF1* y *tetO-H49K*. Los fragmentos de 2,39 Kb (A) y 2,57 Kb (B) contienen el elemento de respuesta a tetraciclinas (TRE) unido al promotor mínimo de citomegalovirus (P_{minCMV}). Este promotor está silenciado en ausencia de unión de un transactivador a la región TRE. A continuación se encuentra la secuencia correspondiente al cDNA de *IF1* (A) o *H49K* (B) y una secuencia de poliadenilación de la β -globina de conejo (p-A β -globina). SexA I, BsrB I y Drd I: sitios de corte para las enzimas de restricción homónimas.

que sobreviven a la microinyección y se implantan, no todos integran el transgén, por lo que sólo un cierto número de ratones nacidos serán transgénicos y con capacidad de transmitir el transgén a la descendencia y por tanto, dar lugar a una colonia (fundadores). En la Tabla 10 se muestran las eficiencias de producción de fundadores para los transgenes IF1 y H49K. Los valores de eficiencias obtenidos son semejantes a los estimados, con algunas variaciones, especialmente en el número de ratones nacidos para la línea *tetO-IF1*.

La eficiencia de la técnica es incluso menor cuando se tiene en cuenta la expresión de la proteína transgénica: se estima que sólo algo más del 50% de los fundadores expresan la proteína a niveles adecuados (Wall, 2001). Por tratarse el nuestro de un sistema inducible por doxiciclina, el análisis de la expresión de la proteína transgénica en los fundadores requirió el cruce de los fundadores con ratones que expresasen un transactivador activable por doxiciclina bien en su forma *On* (rtTA) o en su forma *Off* (tTA). Así, en los tejidos de los ratones dobles transgénicos resultantes donde se expresase el transactivador, se expresaría también la proteína transgénica IF1 humana o H49K en respuesta a doxiciclina (Figura 20).

Tabla 10: Eficiencia de la técnica de microinyección pronuclear. Eficiencias teóricas (primera fila) y eficiencias obtenidas en la microinyección pronuclear para generar los ratones transgénicos *tetO-IF1* (segunda fila) y *tetO-H49K* (tercera fila). N: número de eventos; %: porcentaje de eventos respecto al número de embriones microinyectados.

	Embriones inyectados	Embriones que sobreviven		Embriones que nacen		Ratones con el transgén		Ratones fundadores	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Teórico	-	-	75%	-	20%	-	2-4%	-	1-3%
IF1	707	511	72,28%	48	6,79%	14	1,98%	6	0,85%
H49K	275	182	66,18%	43	15,64%	10	3,64%	7	2,55%

Existen comercialmente varias líneas transgénicas que expresan el transactivador en distintos tejidos (Figura 20). La línea *STOCK-Tg(CMV-rtTA)4Bjd/J*, referida aquí de forma abreviada como *CMV-rtTA*, expresa el transactivador en su versión *On* (rtTA) bajo el control de un promotor de citomegalovirus (CMV), por lo que el rtTA es expresado teóricamente en aquellos tejidos donde este promotor es activo (músculo, riñón, timo y páncreas) (Kistner y cols., 1996). Sólo en una de las 7 líneas fundadoras *tetO-H49K*, la *tetO-H49K-25*, se observó expresión y, sorprendentemente, sólo en estómago (Figura 21D). Desgraciadamente, los anticuerpos contra el transactivador no tienen la suficiente calidad como para detectar la proteína en tejido de ratón (resultados no mostrados), pero el mRNA del transactivador estaba altamente expresado en páncreas de ratones *CVM-rtTA* (resultados no mostrados). Desconocemos pues, si la falta de expresión en páncreas en este sistema se debe a la línea transactivadora o a nuestros transgénicos *tetO-H49K*. Debido a estos inesperados resultados, comenzamos a utilizar otras líneas transactivadoras para testar la expresión de las líneas fundadoras.

La línea *B6.CBA-Tg(CamK2α-tTA)1Mmay*, referida aquí de forma abreviada como *CamKIIα-tTA*, expresa el transactivador *Off* (tTA) en cerebro anterior gracias al promotor del gen de la calcio-

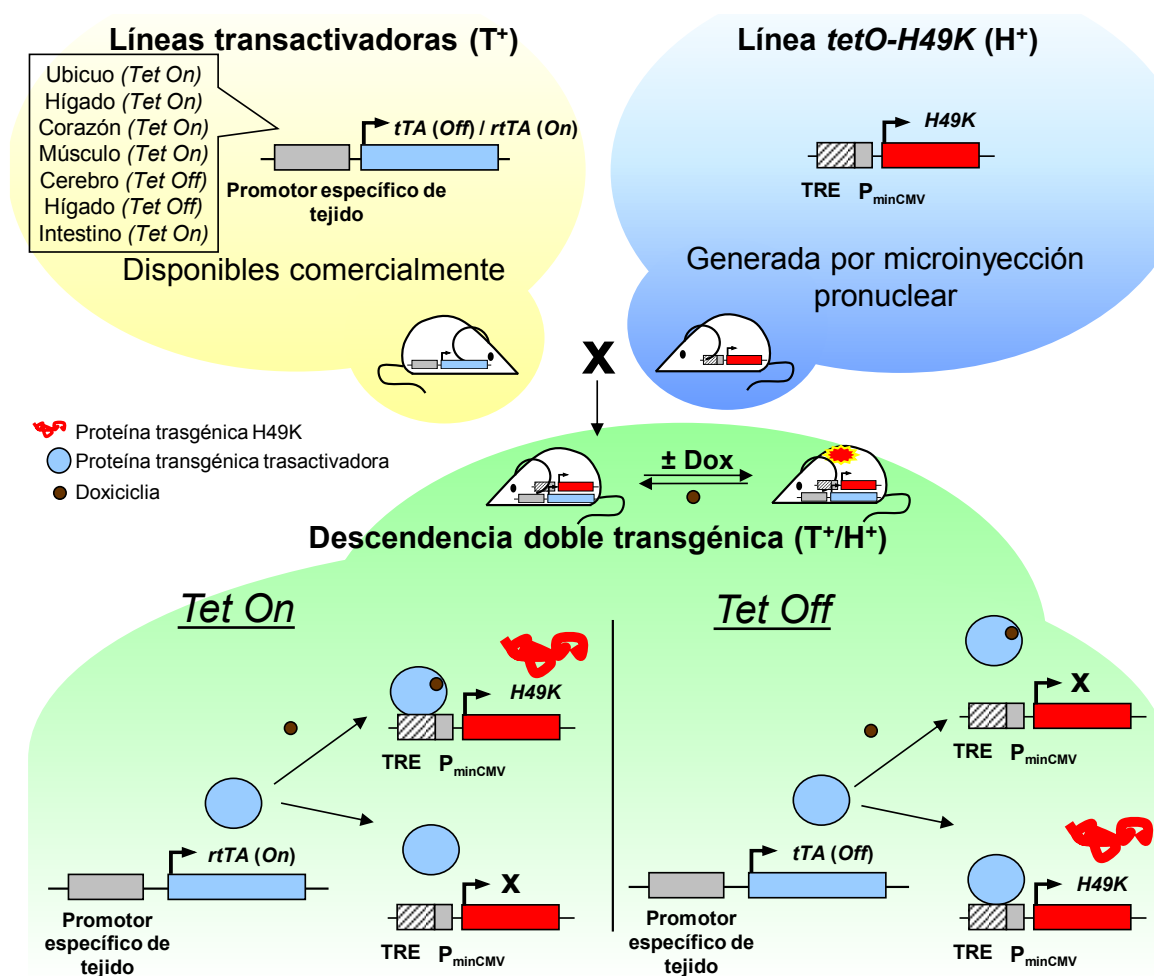


Figura 20: Esquema del funcionamiento del sistema *Tet On* y *Tet Off* en ratones transgénicos. Los ratones dobles transgénicos (T⁺/H⁺) para el transactivador (*rtTA* o *tTA*) y para el gen de interés, en este ejemplo *H49K* (H⁺), expresarán la proteína trasgénica, *H49K* en este ejemplo, de forma tejido específica según el promotor que controla la expresión del transactivador y de forma inducible según la presencia o ausencia de doxiciclina (Dox). En el sistema *Tet On*, la doxiciclina activa al transactivador (*rtTA*) por lo que éste puede unirse al elemento de respuesta a tetraciclinas (TRE) y activar el promotor (*P_{minCMV}*) y por tanto la transcripción del transgén, *H49K*. En el sistema *Tet Off*, el transactivador (*tTA*) se encuentra constitutivamente activo y la doxiciclina lo inactiva impidiendo su unión al TRE y por tanto, la transcripción del transgén *H49K*.

calmodulina kinasa II α (Mayford y cols., 1996). El cruce con esta línea sí demostró ser útil, encontrándose niveles elevados de IF1 humano o *H49K* en cerebro de ratones dobles transgénicos de líneas fundadoras que expresaban el transgén (Figura 21E, G, H y K). Cabe destacar que, en el caso de la línea *tetO-IF1-1* también se encuentra expresión en animales monotransgénicos (positivos sólo para IF1, I⁺), lo que indica que el sistema no está estrictamente regulado por doxiciclina (Figura 21G).

La línea *B6.Cg-Tg(Cebpb-rtTA*S2)1Bjd/Cnrm*, referida aquí de forma abreviada como *LAP-rtTA*, expresa el transactivador *On* avanzado (*rtTA Adv*) en hígado gracias al promotor del gen de la proteína CEBP β (CCAAT/enhancer-binding protein beta), también llamada proteína LAP (*liver-enriched activating protein*) (Schonig y cols., 2002). Gracias al cruce con esta línea pudimos detectar algunas líneas fundadoras útiles que expresasen niveles elevados de IF1 humano o su mutante *H49K* en hígado (Figura 21F, I y J). Tal y como se describe en la bibliografía (Urlinger y cols., 2000;

Schonig y cols., 2002), observamos que este modelo expresa cierta cantidad de transactivador en riñón además de en hígado, encontrando cantidades detectables de H49K en riñones de ratones dobles transgénicos de una de las líneas testadas (Figura 21F). La Figura 21A-C ilustra un ejemplo representativo de líneas transgénicas que no expresan IF1 o H49K en estómago, cerebro o hígado.

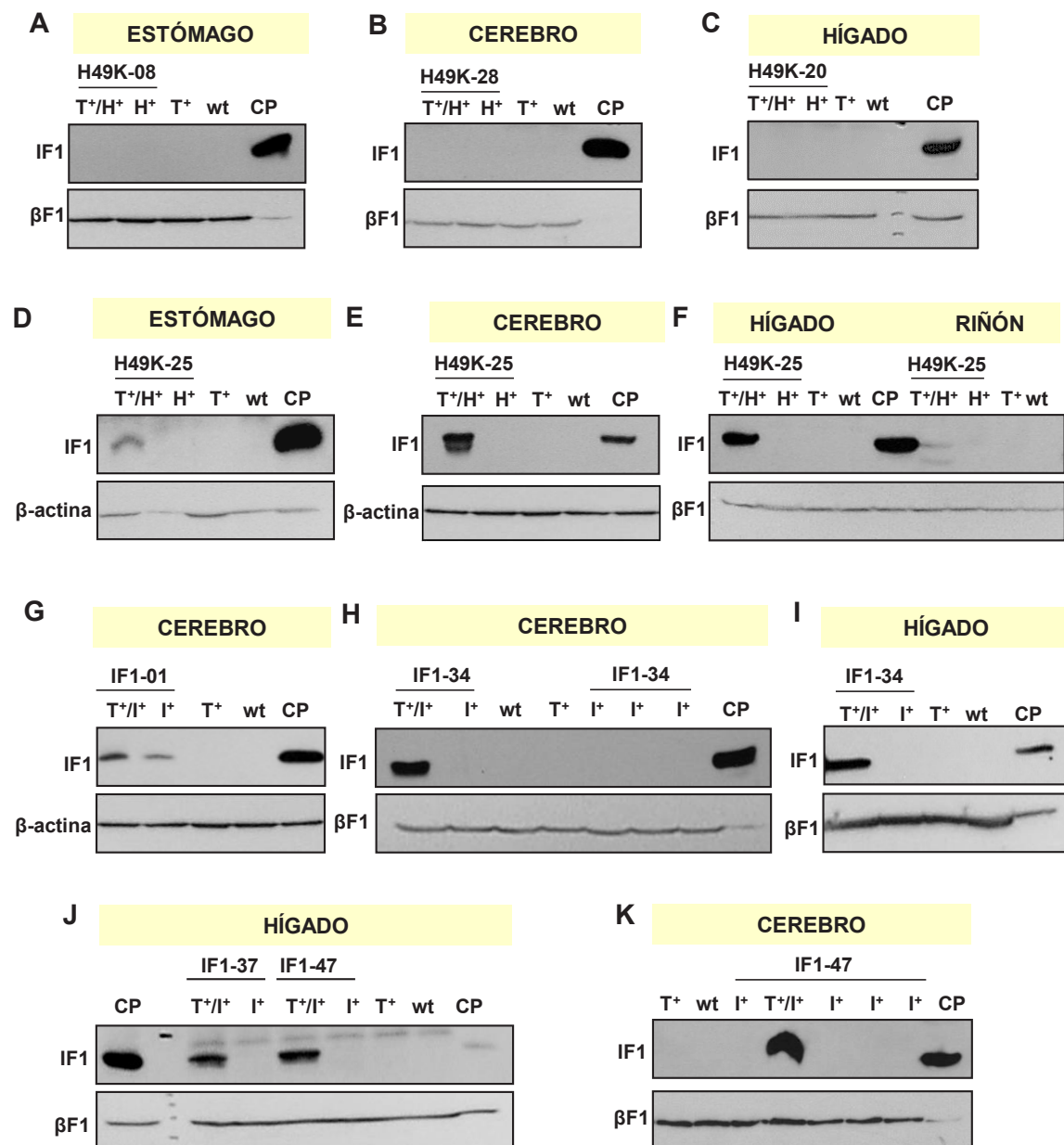


Figura 21: Expresión transgénica en las líneas fundadoras *tetO-IF1* y *tetO-H49K* en distintos tejidos. A-C: ejemplo de *western blots* de líneas fundadoras *tetO-H49K* sin expresión en estómago (cruce con *CMV-rtTA*, A), cerebro (cruce con *CamKIIα-tTA*, B) o en hígado (cruce con *LAP-rtTA*, C). D-K: ejemplos de *western blot* de líneas fundadoras *tetO-H49K* y *tetO-IF1* con expresión en distintos tejidos. El nombre abreviado de la línea fundadora *tet-O* y el tejido aparece en cada figura. T⁺/H⁺: tejido de ratón doble transgénico para el transactivador y para *H49K*; H⁺: tejido de ratón transgénico para *H49K*; T⁺: tejido de ratón transgénico para el transactivador; wt: tejido de ratón negativo para el transactivador y para *H49K*; CP: control positivo, extracto proteico de células HeLa; T⁺/I⁺: tejido de ratón doble transgénico para el transactivador y para *IF1*; I⁺: tejido de ratón transgénico para *IF1*.

La Tabla 11 resume los resultados de las pruebas de expresión de todas las líneas fundadoras, incluyendo el cruce con otra línea transgénica que expresa el transactivador rtTA en intestino (*Villin-rtTA*) (Roth y cols., 2009) que se ha utilizado con posterioridad. De las 7 líneas fundadoras *tetO-H49K* identificadas, sólo la línea *tetO-H49K-25* demostró expresar unos niveles de H49K detectables en el modelo ubicuo, cerebral y hepático (Figuras 21D-F), siendo por tanto una línea muy útil para el estudio de la sobre-expresión de este inhibidor en cerebro e hígado.

Siguiendo las normas de nomenclatura del *International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice* se le ha asignado a esta línea el siguiente nombre:

*B6.CBA-Tg(tetO-ATPIF1*H49K)25Czv*

aunque, en el presente trabajo, se utiliza la forma abreviada *tetO-H49K-25* para referirse a ella.

En cuanto a las 6 líneas fundadoras *tetO-IF1* identificadas, varias de ellas pueden ser útiles para estudiar la sobre-expresión de IF1 en cerebro (*tetO-IF1-1*, *tetO-IF1-34* y *tetO-IF1-47*, Figuras 21G-H y K) o en hígado (*tetO-IF1-34*, *tetO-IF1-37* y *tetO-IF1-47* Figuras 21 I-J) y se les ha asignado el siguiente nombre:

B6.CBA-Tg(tetO-ATPIF1)#Czv,

dónde # es el número de línea (1, 34, 37 o 47 según corresponda).

Línea fundadora	Expresión en dobles transgénicos			
	x Línea transactivadora			
	<i>CMV-rtTA</i>	<i>CamKIIα-tTA</i>	<i>LAP-rtTA</i>	<i>Villin-rtTA</i>
<i>tetO-H49K-08</i>	No (Figura 21A)	No	-	-
<i>tetO-H49K-20</i>	No	No	No (Figura 21C)	-
<i>tetO-H49K-22</i>	No	-	No	-
<i>tetO-H49K-25</i>	Sí (Fig. 21D)	Sí (Fig. 21E)	Sí (Fig. 21F)	-
<i>tetO-H49K-28</i>	No	No (Figura 21B)	No	-
<i>tetO-H49K-32</i>	No	No	-	-
<i>tetO-H49K-34</i>	No	No	-	-
<i>tetO-IF1-1</i>	-	Sí (Fig. 21G)	No	Sí
<i>tetO-IF1-32</i>	-	No	No	-
<i>tetO-IF1-34</i>	-	Sí (Fig. 21H)	Sí (Fig. 21I)	Sí
<i>tetO-IF1-37</i>	-	No	Sí (Fig. 21J)	-
<i>tetO-IF1-47</i>	-	Sí (Fig. 21K)	Sí (Fig. 21J)	Sí
<i>tetO-IF1-48</i>	-	No	No	-

Tabla 11: Resumen de la prueba de expresión de las líneas fundadoras *tetO-IF1* y *tetO-H49K*. Ausencia ("No") o expresión ("Sí") de IF1 o H49K en el tejido correspondiente tras inducción con (*CMV-rtTA*, *LAP-rtTA*, *Villin-rtTA*) o sin doxiciclina (*CamKIIα-rtTA*). Entre paréntesis, figura dónde se encuentra el *western blot* correspondiente. Un ejemplo de *western blot* de una línea con ausencia de expresión puede consultarse en la Figura 21A-C. Los guiones (-) indican que no se ha estudiado la expresión en ese cruce. Recuadrada en rojo, la línea fundadora seleccionada para estudiar el fenotipo transgénico. *CMV-rtTA*: línea transgénica que expresa el transactivador rtTA de forma ubicua bajo un promotor de citomegalovirus (Kistner y cols., 1996); *CamKIIα-tTA*: línea transgénica que expresa el transactivador tTA en cerebro anterior bajo un promotor de calcio-calmodulina quinasa IIα (Mayford y cols., 1996); *LAP-rtTA*: línea transgénica que expresa el transactivador rtTA en hígado bajo un promotor de LAP (*liver-enriched activating protein*) (Schonig y cols., 2002); *Villin-rtTA*: línea transgénica que expresa el transactivador rtTA en intestino bajo el promotor de vilina (Roth y cols., 2009).

4.3.2. Modelo animal de sobre-expresión condicional de H49K en hígado: caracterización de la expresión

Elegimos la línea *tetO-H49K-25* para generar un modelo de interferencia con la fosforilación oxidativa en hígado. Puesto que el hígado de ratón expresa gran cantidad de IF1 endógeno (Figura 8A), decidimos sobre-expresar H49K ya que es más potente como inhibidor de la H^+ -ATP sintasa (Figuras 9, 11 y 13) (Schnizer y cols., 1996; Cabezon y cols., 2000b). Para ello, cruzamos la línea *tetO-H49K-25* con la línea *LAP-rtTA* y trabajamos con la camada resultante obteniendo, como se verá a continuación, una expresión hepática y condicionada de H49K en los ratones dobles transgénicos tratados con doxíciclina.

En primer lugar, caracterizamos el patrón de expresión transgénica por *western blot* e inmunohistoquímica. El hígado de los ratones dobles transgénicos (Figura 22A) expresa el inhibidor H49K al ser tratados con doxíciclina para inducir la expresión, aunque con niveles variables entre miembros de la misma camada (Figura 22B). Los ratones que son negativos para alguno o ambos transgenes (*IF1* o *rtTA*), no expresan cantidades detectables de H49K (Figura 22B) y son considerados de manera agrupada como controles de ahora en adelante. La expresión de H49K en los ratones dobles transgénicos está fuertemente regulada por doxíciclina, ya que animales dobles transgénicos sin tratamiento con doxíciclina demostraron nula expresión del transgén, al igual que los ratones controles tratados o no con doxíciclina (Figura 22C).

El patrón de expresión hepático es mitocondrial aunque difuso, con zonas de mayor expresión especialmente en regiones perivasculares y otras con poca o nula expresión tal como se observa en la tinción de IF1 humano por inmunohistoquímica en ratones de 15 días de edad (Figura 23).

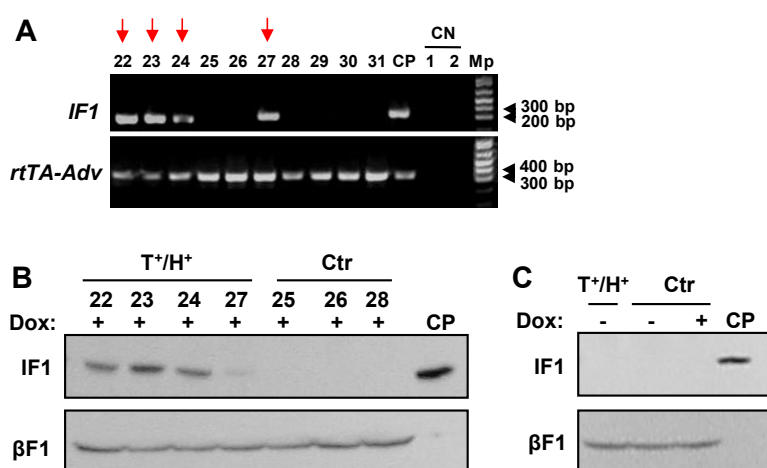


Figura 22: Expresión de H49K en hígado en la línea *tetO-H49K-25* por *western blot*. **A:** ejemplo de genotipaje para el transgén *H49K* (*IF1*) y para el transactivador (*rtTA-Adv*) de una camada de ratones resultante de un cruce de la línea *tetO-H49K-25* y la línea *LAP-rtTA*. Las flechas señalan los ratones dobles transgénicos. CP: control positivo, PCR con plásmido *pCMV-SPORT6-H49K* como muestra. CN1: control negativo, PCR con DNA de ratón *wt* como muestra. CN2: control negativo, PCR con agua en lugar de muestra. Mp, Marcador de peso molecular. **B-C:** *Western blots* de extractos de proteínas hepáticas de ratones tratados con doxíciclina (+, **B** y **C** tercer carril) y sin tratamiento con doxíciclina (-, **C**) para inducir o no la expresión del transgén *H49K* respectivamente. Dox: doxíciclina. T⁺/H⁺: ratón doble transgénico para el transactivador y para *H49K*; Ctr: ratón con sólo uno o ninguno de los transgenes transactivador y *H49K*; CP: control positivo, extracto proteico de células HeLa.

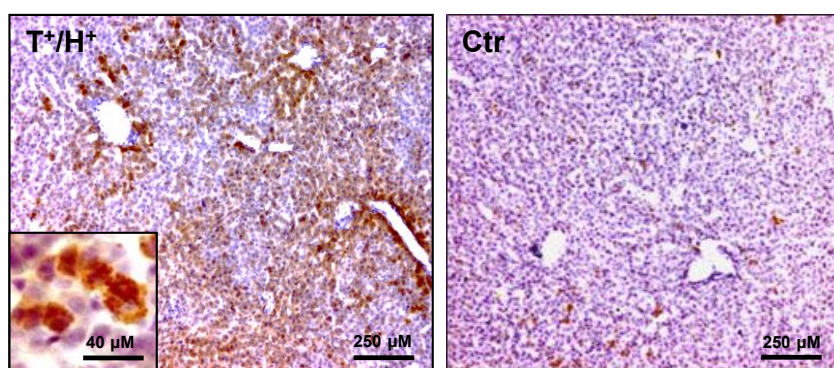


Figura 23: Expresión de H49K en hígado de la línea *tetO-H49K-25* por inmunohistoquímica. Inmunohistoquímica para IF1 humano con tinción de núcleos de una sección de hígado de un ratón doble transgénico (T⁺/H⁺, izquierda) y de un ratón control (Ctr, derecha) de 15 días de edad. La tinción es específica para IF1 humano y tiene un patrón de expresión citoplasmático granular típico de mitocondrias (sección aumentada a la izquierda).

4.3.3. La expresión de H49K en hígado interfiere la fosforilación oxidativa.

Para estudiar las consecuencias fenotípicas que la sobre-expresión de H49K hepática tiene en nuestro modelo, todos los experimentos realizados, salvo que se indique lo contrario, se llevaron a cabo tras someter a los animales a un periodo de ayuno (ver Materiales y Métodos, sección 3.5.1). Este estímulo de estrés metabólico sitúa al hígado en una situación fisiológica en la que su funcionalidad es clave para el mantenimiento de la homeostasia del organismo, y donde se prevé que una interferencia con el metabolismo energético hepático tenga consecuencias fácilmente detectables.

En primer lugar y como prueba del efecto inhibitorio de H49K sobre la H⁺-ATP sintasa observado ya en células (Figuras 13A y 14C), medimos la respiración con varios sustratos respiratorios de mitocondrias aisladas de hígado de ratones adultos dobles transgénicos y controles tratados con doxiciclina. Tal y como observamos en los modelos celulares las mitocondrias hepáticas de los ratones que sobre-expresan H49K presentan un perfil respiratorio funcional pero significativamente más atenuado que las mitocondrias hepáticas control utilizando succinato como sustrato (Figura 24A-E).

Sin embargo, el perfil respiratorio obtenido con piruvato más malato (Figura 24F) es, tanto en controles como en dobles transgénicos, mucho más atenuado que con succinato (Figura 24A), por lo que, aunque el perfil respiratorio está también disminuido, la significatividad es menor (Figura 24G-J).

El estado IV, es decir, el consumo de oxígeno en ausencia de ADP y de inhibidores resultó ser significativamente menor tanto con succinato como con piruvato más malato como sustrato (Figuras 24B y G). El estado III o respiración estimulada por ADP está igualmente disminuido en presencia de succinato (Figura 24C). La significativa disminución de la respiración sensible a oligomicina (Figura 24D) pone de manifiesto el efecto inhibitorio de la sobre-expresión de H49K sobre la H⁺-ATP sintasa. Sin embargo y al igual que en el modelo celular (Figura 13B), la respiración en presencia de FCCP o estado desacoplado es también menor en las mitocondrias que sobre-expre-

san H49K (Figura 24E), lo que sugiere un efecto inhibitorio de la expresión de esta proteína sobre algún complejo respiratorio. Para estudiar esta posibilidad, analizamos la cantidad de proteína de los distintos complejos respiratorios en el hígado de estos ratones mediante *western blot*. No encontramos ningún complejo respiratorio sub-expresado en los ratones dobles transgénicos (Figura 25A-B) lo que sugiere que el posible efecto inhibitorio se encuentra en la actividad funcional de los complejos y no en su expresión.

Está descrito que la inhibición funcional del complejo citocromo c oxidasa ejerce un papel importante en la regulación de toda la cadena respiratoria (Ramzan y cols., 2010). Efectivamente, encontramos que la actividad de este complejo se encuentra significativamente disminuida en las mitocondrias hepáticas de los ratones dobles transgénicos (Figura 25C), lo que puede explicar el defecto en respiración máxima observado en estos animales (Figura 24E).

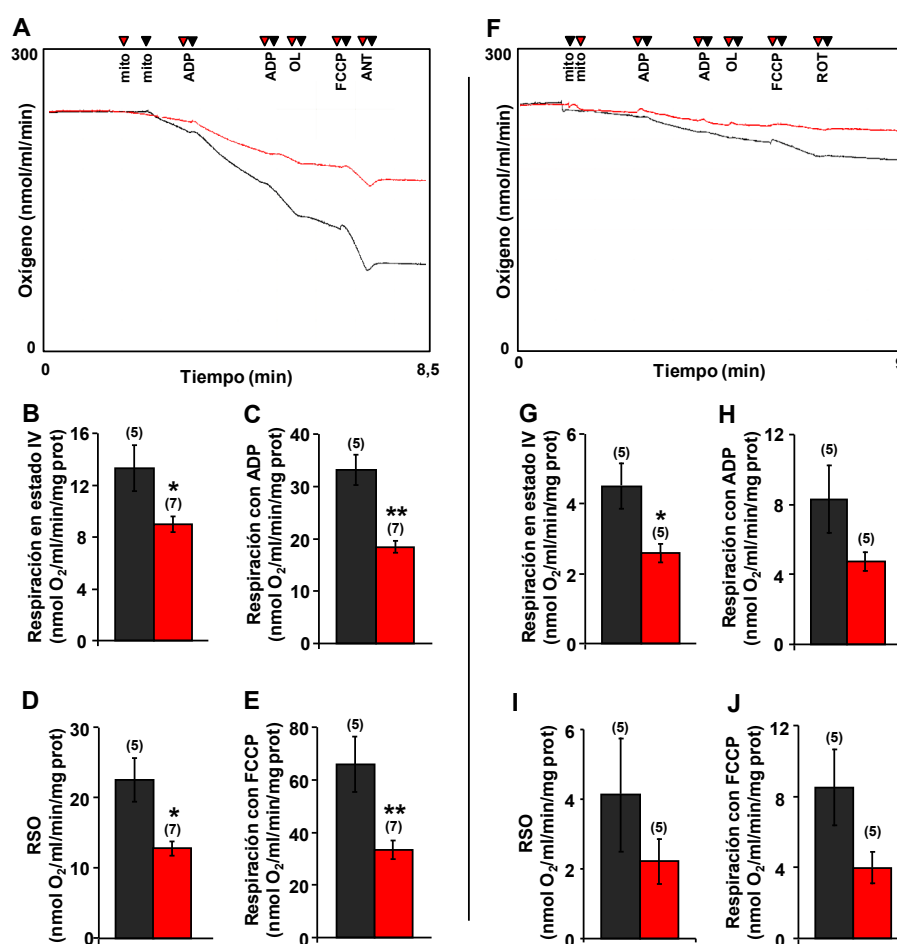


Figura 24: Respiración de mitocondrias aisladas de hígado de ratón. Consumo de oxígeno mitocondrial con succinato (panel izquierdo, A-E) o piruvato más malato (panel derecho, F-J) como sustrato. Las gráficas (A y F) muestran un ejemplo del registro obtenido con el electrodo de Clark del perfil respiratorio de mitocondrias hepáticas de ratones dobles transgénicos (línea roja) superpuesto con uno de mitocondrias hepáticas de ratones controles (línea negra). Los histogramas (B-E y G-J) representan la media \pm S.E.M. de los consumos respiratorios de las mitocondrias dobles transgénicas (barras rojas) y las mitocondrias control (barras negras) obtenidos en los distintos estados respiratorios. El número de experimentos aparece entre paréntesis encima de cada barra. *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student; **: $p \leq 0,01$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student. Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxiciplina. Mito: Mitocondrias; OL: Oligomicina; ANT: Antimicina; ROT: Rotenona; RSO: Respiración Sensible a Oligomicina.

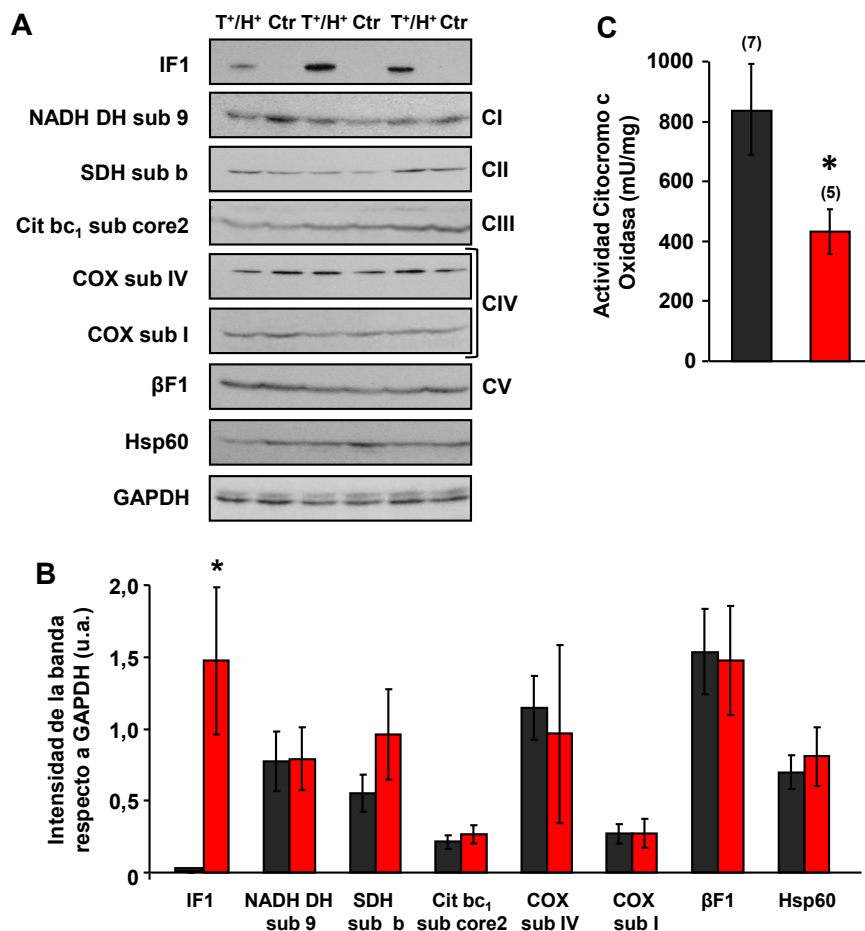


Figura 25: Complejos respiratorios en extractos hepáticos. A-B: Niveles proteicos de los distintos complejos respiratorios, βF1 ATPasa, IF1, Hsp60 y GAPDH en extractos hepáticos de ratones adultos dobles transgénicos (T⁺/H⁺, barras rojas) y de ratones control (Ctr, barras negras). El histograma representa la densitometría de las bandas expresada como la media ± S.E.M. de la intensidad de la banda respecto a GAPDH de al menos 5 muestras. u.a.: unidades arbitrarias; NADH DH sub 9: subunidad 9 de la NADH deshidrogenasa, (complejo I); SDH sub b: subunidad b de la succinato deshidrogenasa (complejo II); Cit bc₁ sub core2: subunidad *core 2 protein* del complejo citocromo bc₁ (complejo III); COX sub IV y COX sub I: subunidad 4 o 1 respectivamente de la citocromo c oxidasa (complejo IV); βF1: subunidad β de la ATPasa mitocondrial (complejo V). C: Actividad citocromo oxidasa medida en mitocondrias de los mismos ratones dobles transgénicos y controles de A-B. El histograma representa la media ± S.E.M. del número de muestras entre paréntesis. *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba t de Student. Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxiciclina.

4.3.4. La expresión de H49K en hígado disminuye la carga energética celular

Una inhibición de la ATP sintasa tiene como consecuencia inevitable una alteración de la carga energética celular como consecuencia de la reducción en la síntesis de ATP mitocondrial. Este efecto se pone de manifiesto por un aumento de la razón AMP/ATP, lo que supone un estímulo de estrés metabólico para la célula. En nuestro modelo animal de sobre-expresión de H49K encontramos una significativa reducción de los niveles de ATP acompañada de un aumento significativo en los niveles de AMP (Figura 26A) en ratones adultos dobles transgénicos que expresan H49K respecto a los controles. Consecuentemente, la razón AMP/ATP está claramente aumentada en los ratones que están expresando H49K (Figura 26B).

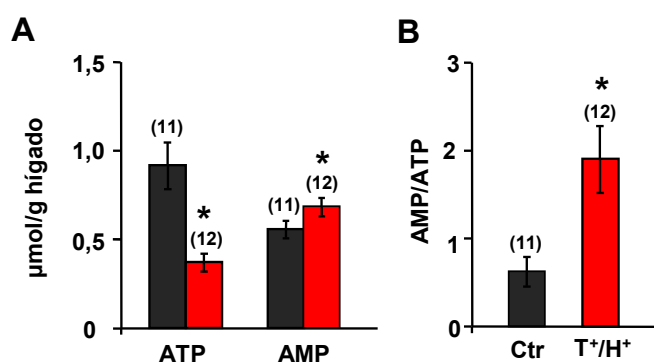


Figura 26: Carga energética celular en hígado de ratones adultos. Cantidad presente en extractos hepáticos de ATP y AMP (A) y razón AMP/ATP (B) en ratones dobles transgénicos (T*/H*, barras rojas) y en controles (Ctr, barras negras). Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxíciclina. Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

Uno de los sensores de carga energética celular que actúa como un regulador de las vías metabólicas relacionadas con la provisión de energía celular es la enzima AMPK. En situaciones de baja carga energética, es decir, cuando la razón AMP/ATP es elevada, la AMPK se activa por fosforilación estimulando las rutas catabólicas (oxidación de ácidos grasos, cetogénesis, captación de glucosa...) e inhibiendo las anabólicas (síntesis de ácidos grasos, colesterol, proteínas...) para así generar más energía. En consonancia con los resultados anteriores, la AMPK en ratones adultos sobre-expresando H49K se encuentra activada, con niveles más elevados tanto de AMPK como de su forma fosforilada activa p-AMPK (Figura 27).

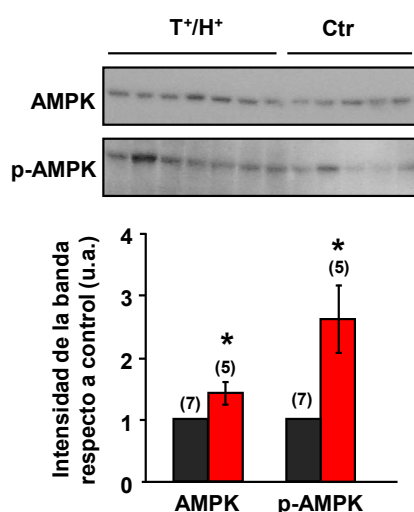


Figura 27: Expresión de AMPK y p-AMPK en hígado de ratones adultos. Niveles proteicos de AMPK y p-AMPK en ratones dobles transgénicos (T*/H*, barras rojas) y en ratones control (Ctr, barras negras). Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxíciclina. Los histogramas representan la densitometría de las bandas expresada como la media \pm S.E.M. de la intensidad de la banda respecto a la del control de cada experimento. El número de experimentos aparece entre paréntesis encima de cada barra. u.a.: unidades arbitrarias; *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

4.3.5. Los ratones que expresan H49K desarrollan hipoglucemia

La alteración de la carga energética del hígado, principal órgano regulador de la homeostasia de la glucosa, puede tener repercusiones importantes en las rutas metabólicas de este órgano, con consecuencias a nivel tisular y sistémico. Analizamos la presencia de ciertos metabolitos en sangre para estudiar si la afectación hepática podía tener consecuencias a nivel sistémico. La glucemia es, posiblemente, uno de los parámetros metabólicos mejor regulados en mamíferos y en dicha regulación juega una función relevante el hígado. En condiciones de ayuno, se pone en marcha una señalización hormonal que, en última instancia, lleva al hígado a liberar glucosa a la sangre y así mantener la glucemia. Si el ayuno es corto, se movilizan las reservas de glucosa hepática almacenada como glucógeno mediante la glucogenólisis, pero si el ayuno persiste, el organismo necesita producir glucosa *de novo* a través de la gluconeogénesis hepática. Esta ruta requiere cantidades

altas de energía que proviene, principalmente de la mitocondria, de la β -oxidación acoplada al ciclo de Krebs y a la fosforilación oxidativa de los ácidos grasos movilizados desde el tejido adiposo. Una deficiente OXPHOS en el hígado puede llevar a una insuficiente gluconeogénesis, con la consiguiente disminución de la glucosa sanguínea.

La glucemia en ratones dobles transgénicos ayunados de 0 (Figura 28A) y 15 (Figura 28B) días de edad se encuentra significativamente disminuida respecto a los ratones controles. Encontramos así mismo una disminución en el lactato sanguíneo en ratones dobles transgénicos de 15 días respecto a los controles (Figura 28B), no así en ratones recién nacidos (Figura 28A).

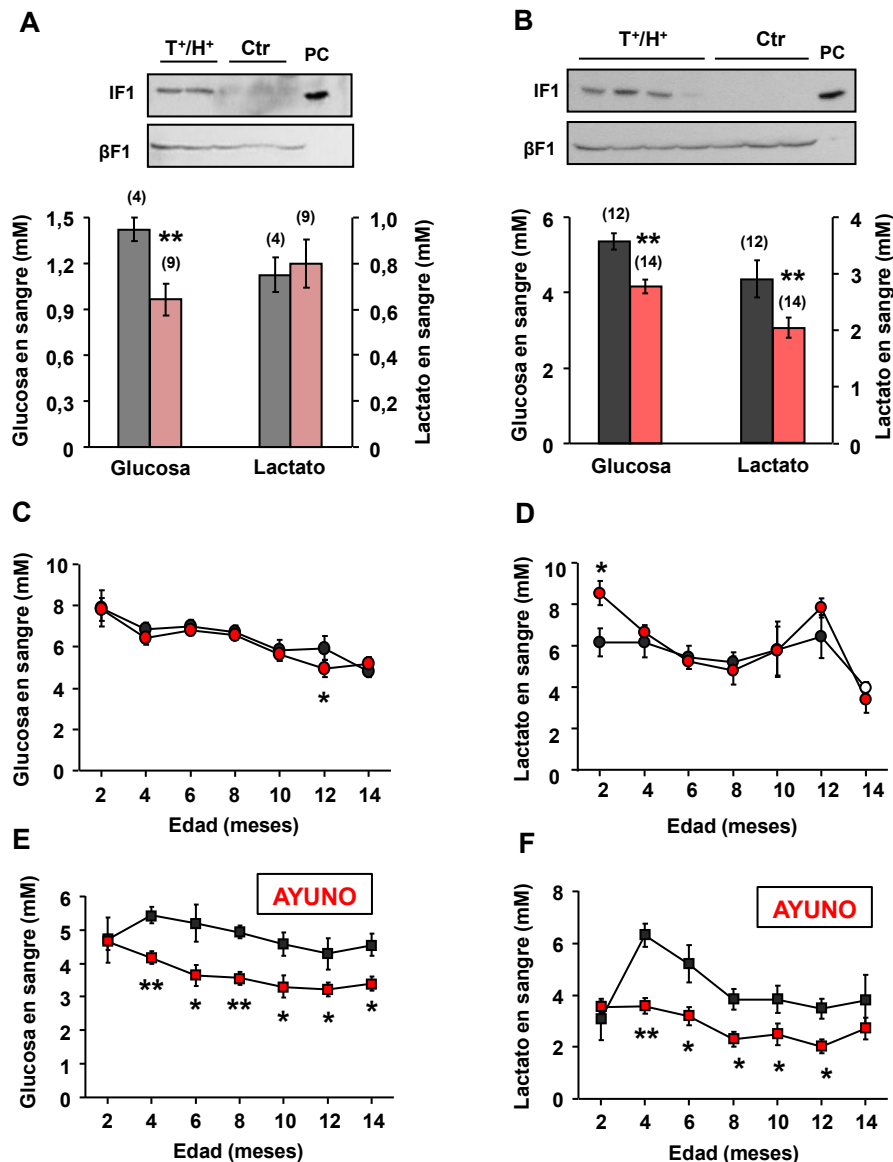


Figura 28: Glucemia y lactato en sangre de ratones de 0 días de edad (A), 15 días de edad (B) y adultos (C-F). A-B: Concentración en sangre de glucosa y lactato en ratones dobles transgénicos (T^{+/H⁺}, barras rojas) y en ratones control (Ctr, barras negras) de 0 (A) o 15 (B) días de edad. Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis (varias camadas analizadas). Sobre cada histograma, se muestra un *western blot* representativo de la expresión de IF1 en una misma camada. C-F: Evolución en el tiempo de la glucosa (C, E) y lactato (D, F) en sangre de ratones adultos dobles transgénicos (en rojo) y en ratones control (en negro) sometidos (E-F, cuadrados) o no (C-D, círculos) a ayuno. Los gráficos representan la media \pm S.E.M. de al menos 6 muestras de camadas diferentes. Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxiciclina. * $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student; **: $p \leq 0,01$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

Analizamos además, la evolución de estos dos parámetros sanguíneos con la edad tanto en ratones alimentados como ayunados 12h. En el primer caso, no observamos diferencias significativas ni en la glucosa (Figura 28C) ni en el lactato (Figura 28D). Sin embargo, cuando los ratones eran sometidos a ayuno, los dobles transgénicos mostraban una menor concentración tanto de glucosa (Figura 28E) como de lactato (Figura 28F) desde los 4 hasta los 14 meses de edad.

Estos resultados ponen de manifiesto la limitación de la gluconeogénesis en ratones que expresan H49K. Por otro lado, la disminución de la concentración de lactato en esta situación sugiere la utilización oxidativa de este metabolito por tejidos extra-hepáticos como el corazón.

Para analizar otros efectos de la posible afectación hepática por sobre-expresión de H49K, analizamos la concentración en sangre de acilcarnitinas y de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados en ratones adultos. Las acilcarnitinas son intermediarios del catabolismo de los ácidos grasos y de algunos aminoácidos ramificados. Son necesarias para la entrada de ácidos grasos en las mitocondrias, dónde vuelven a formar acil-CoAs para su oxidación. Así, su concentración en sangre es un reflejo de la concentración de acil-CoA en mitocondrias (Millington y cols., 2011). No observamos variación significativa de ninguna acilcarnitina en ratones adultos que expresan H49K (Figura 29), salvo un ligero aumento en propionilcarnitina en el límite de la significatividad ($p = 0,06$ cuando se compara frente a control según la prueba t de Student) (Figura 29).

Por otro lado, dentro de los 29 compuestos nitrogenados medidos en sangre encontramos una reducción significativa en la concentración de los aminoácidos gluconeogénicos alanina y glutamato en ratones que sobre-expresan H49K, así como en 3-metilhistidina (Tabla 12), un marcador de proteólisis muscular. La isoleucina, un aminoácido relacionado con la regulación de la glucemia se encuentra, sin embargo, significativamente elevado en ratones con sobre-expresión hepática de H49K (Tabla 12).

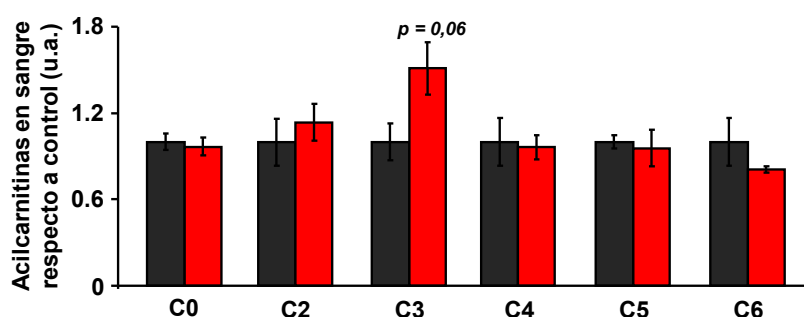


Figura 29: Acilcarnitinas en sangre. Concentración de distintas acilcarnitinas en sangre de ratones adultos dobles transgénicos (barras rojas) respecto a ratones control (barras negras). Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxiciclina. Los histogramas representan la media \pm S.E.M. de 6 muestras. u.a.: unidades arbitrarias; p: p-valor cuando se compara frente a control según la prueba t de Student; C0: carnitina libre; C1: acilcarnitina; C3: propionilcarnitina; C4: butiril e isobutirilcarnitina; C5: isovalerilcarnitina; C6: hexanoilcarnitina.

Tabla 12: Concentración de aminoácidos y otros compuestos nitrogenados en sangre de ratones adultos. Valores de concentración en sangre (μM) en ratones adultos ayunados controles (Ctr) y dobles transgénicos (T^+/H^+). Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxiciclina. La concentración en sangre (μM) para cada compuesto corresponde a la media \pm S.E.M. de 6 muestras. En negrita, los valores donde $p < 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba t de Student.

	Ctr (μM)	T^+/H^+ (μM)	t -student
Fosfoserina	19,09 \pm 0,23	18,43 \pm 0,82	0,58
Fosfoetanolamina	4,66 \pm 0,41	3,48 \pm 0,37	0,15
Ácido Aspártico	30,73 \pm 1,51	28,20 \pm 1,62	0,42
Treonina	61,86 \pm 5,55	67,93 \pm 5,85	0,59
Serina	65,14 \pm 1,77	68,42 \pm 3,15	0,52
Asparagina	15,27 \pm 0,78	15,49 \pm 0,52	0,87
Ácido Glutámico	79,11 \pm 3,63	64,17 \pm 2,25	0,03
Glutamina	302,26 \pm 6,94	307,34 \pm 15,40	0,83
Prolina	29,77 \pm 2,13	31,81 \pm 1,32	0,56
Glicina	183,79 \pm 5,69	188,47 \pm 17,02	0,85
Alanina	139,79 \pm 4,74	117,35 \pm 3,18	0,02
Citrulina	25,83 \pm 1,25	31,55 \pm 2,45	0,16
Ácido α -Amino-n-Butirico	5,32 \pm 0,82	8,07 \pm 1,34	0,23
Valina	106,13 \pm 5,35	104,92 \pm 3,54	0,89
Metionina	16,08 \pm 1,42	15,80 \pm 1,19	0,91
Isoleucina	46,18 \pm 2,31	55,48 \pm 2,13	0,05
Leucina	72,93 \pm 2,72	82,67 \pm 3,03	0,11
Tirosina	15,99 \pm 0,93	12,23 \pm 1,19	0,10
Fenilalanina	23,49 \pm 0,96	24,11 \pm 1,64	0,81
Etanolamina	54,08 \pm 3,40	58,43 \pm 3,89	0,55
Triptófano	1,19 \pm 0,36	3,06 \pm 0,53	0,06
Ornitina	18,81 \pm 0,87	20,44 \pm 1,51	0,50
Lisina	159,85 \pm 7,41	171,00 \pm 9,08	0,50
Histidina	9,86 \pm 0,62	10,95 \pm 0,54	0,35
1-Metil-Histidina	0,88 \pm 0,18	2,57 \pm 0,57	0,06
3-Metil-Histidina	3,10 \pm 0,35	1,72 \pm 0,28	0,05
Arginina	44,92 \pm 2,61	47,80 \pm 2,82	0,59
Taurina	765,86 \pm 28,55	641,15 \pm 24,75	0,03
Urea	6535,39 \pm 241,29	6282,76 \pm 393,65	0,69

Además, exploramos las consecuencias de la sobre-expresión de H49K a nivel tisular midiendo la cantidad de diversos ácidos orgánicos presentes en hígado de ratones adultos (Figura 30). No observamos variación en los niveles de 3-hidroxibutirato (cuerpo cetónico) ni en los niveles de varios ácidos del ciclo de Krebs (Figura 30). El nivel de lactato, aunque ligeramente superior en los ratones que expresan H49K, tampoco demostró diferencias significativas (Figura 30). Sin embargo, encontramos una disminución significativa en los niveles de piruvato hepático (Figura 30), metabolito clave en la encrucijada de varias rutas metabólicas hepáticas.

4.3.6. Sobre-expresión hepática de H49K y estrés oxidativo

Debido a la interferencia demostrada de la sobre-expresión de H49K con la fosforilación oxidativa, con la consecuente disminución de actividad de la CTE, decidimos estudiar el posible estrés oxidativo producido por especies reactivas de oxígeno (ROS) y las defensas antioxidantes en hígado.

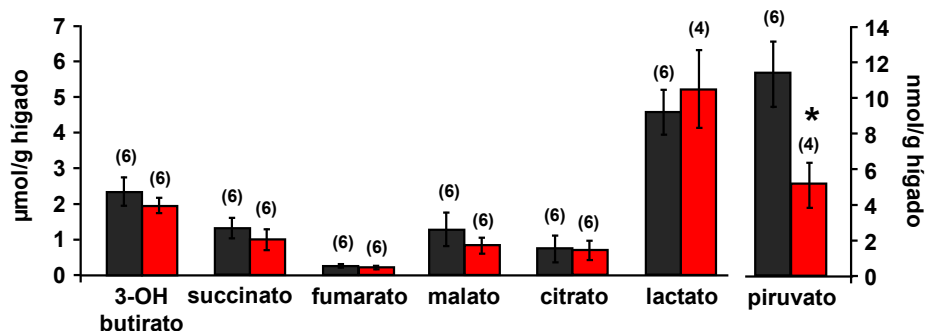


Figura 30: Ácidos orgánicos en extractos hepáticos. Cantidad de distintos ácidos orgánicos en extractos hepáticos de ratones adultos dobles transgénicos (barras rojas) y de ratones adultos control (barras negras). Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxiciclina. Los histogramas representan la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

do de ratones transgénicos. En ratones de 15 días, encontramos una sobre-expresión significativa de la enzima antioxidante superóxido dismutasa (SOD-2) (Figura 31A), aunque no observamos cambios en la expresión de catalasa (Figura 31A).

Por otro lado, analizamos la expresión de la proteína UCP-2 ya que la sobreexpresión de esta proteína desacoplante interviene en la modulación de ROS mitocondriales. No encontramos cambios en la expresión de ésta proteína en hígado de ratones de 15 días (Figura 31B).

Un efecto biológico de la acumulación de ROS en la célula es la carbonilación de proteínas. De manera congruente con la sobre-expresión de SOD-2 observada en ratones dobles transgénicos, encontramos que la carbonilación de ciertas proteínas hepáticas en ratones es menor que en controles (Figura 32).

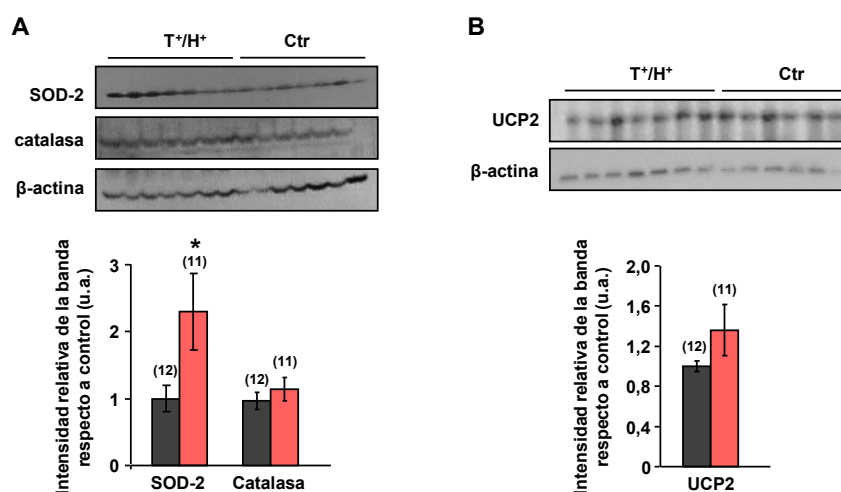


Figura 31: Expresión de proteínas antioxidantes en extractos hepáticos de ratones de 15 días de edad. Niveles proteicos de superóxido dismutasa 2 (SOD-2), catalasa y de la proteína desacoplante mitocondrial 2 (UCP-2) en ratones dobles transgénicos (T⁺/H⁺, barras rojas) y en ratones control (Ctr, barras negras). Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxiciclina. Los histogramas representan la densitometría de las bandas expresada como la media \pm S.E.M. de la intensidad de la banda relativa a β -actina respecto a controles del número de muestras indicado entre paréntesis. u.a.: unidades arbitrarias. *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

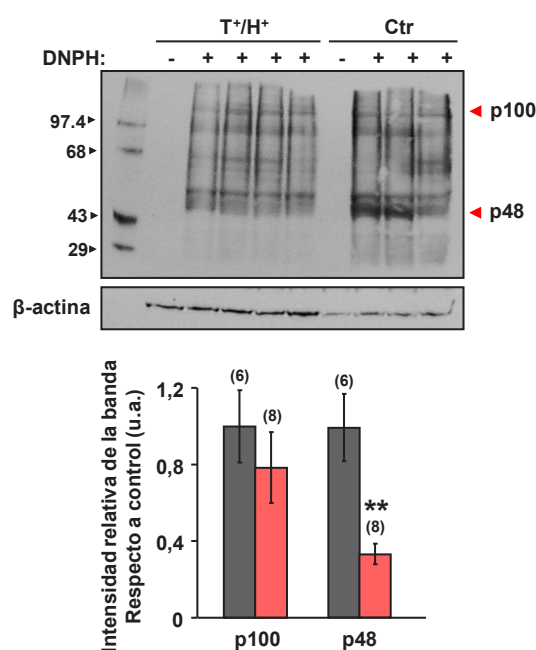


Figura 32: Carbonilación de proteínas en extractos hepáticos de ratones de 15 días de edad. Carbonilación de proteínas en ratones dobles transgénicos (T⁺/H⁺, barras rojas) y en ratones control (Ctr, barras negras). Tanto los ratones dobles transgénicos como los controles fueron sometidos al mismo tratamiento con doxiciclina. Señaladas por flechas rojas en el *western blot* se indican las proteínas representativas seleccionadas, p100 y p48, para cuantificar el grado de oxidación de las muestras. El histograma representa la densitometría de las bandas seleccionadas relativas a β -actina expresadas como la media \pm S.E.M. de la intensidad de la banda respecto a controles del número de muestras indicado entre paréntesis. DNPH: dinitrofenilhidracina. u.a.: unidades arbitrarias. **: $p \leq 0,01$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

4.3.7. El modelo Tet *Off* de sobre-expresión de H49K confirma los hallazgos fenotípicos observados en el modelo Tet *On*

Para confirmar que los resultados fenotípicos obtenidos no dependen del modelo condicional escogido, sobre-expresamos H49K en el modelo opuesto, es decir, aquel en el que la sobre-expresión hepática de H49K sólo se da en ausencia de doxiciclina (modelo Tet *Off*). Para ello, cruzamos nuestra línea transgénica *tetO-H49K-25* con la línea *B6.Cg-Tg(Cebpb-tTA)5Bjd/J* (o *LAP-tTA*) (Kistner y cols., 1996) y realizamos los experimentos con ratones de 2-3 meses resultantes de dicho cruce en ausencia de tratamiento con doxiciclina y en ayuno. La expresión hepática de H49K en estos ratones dobles transgénicos, si bien menos intensa, es semejante a la obtenida con el sistema Tet *On* (Figura 33), con un patrón mitocondrial (Figura 33A) y un fuerte control por doxiciclina (Figura 33B) ya que la presencia de ésta en animales dobles transgénicos anula la expresión de H49K en hígado (Figura 33B). Los ratones ayunados que sobre-expresan H49K en este modelo, muestran también una concentración de glucosa y de lactato en sangre significativamente menor respecto a los controles (Figura 33C).

Las diferencias en el perfil respiratorio con succinato de las mitocondrias hepáticas se conservan como en el modelo Tet *On* (Figura 34), excepto la reducción en estado IV (Figura 34B).

La sobre-expresión de H49K tampoco afecta a la cantidad proteica de los distintos complejos respiratorios que, aparentemente, permanece constante (Figura 35A-B). Al igual que en el caso de la sobre-expresión de H49K en el sistema Tet *On* la actividad citocromo c oxidasa es significativamente menor en las mitocondrias de ratones que sobre-expresan H49K (Figura 35C).

En definitiva, el modelo de sobreexpresión hepática de H49K produce un fenotipo semejante tanto en la versión *On*, como en la versión *Off* del modelo condicional.

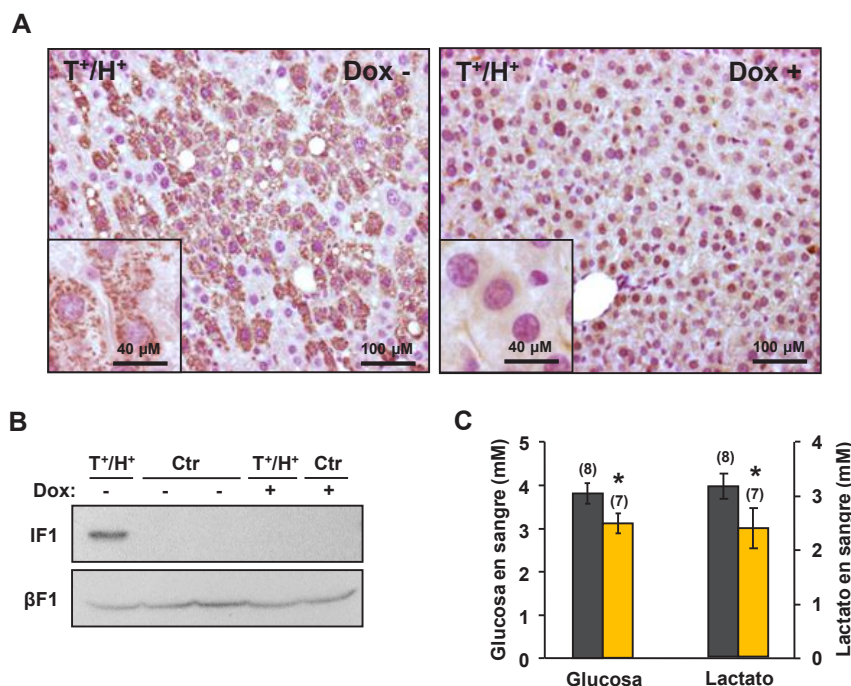


Figura 33: Expresión condicionada de H49K en hígado, modelo *Tet Off*. **A:** Inmunohistoquímica para IF1 humano y tinción de núcleos de una sección de hígado de ratones adultos dobles transgénicos (T⁺/H⁺) sin (-, izquierda) o con (+, derecha) tratamiento con doxiciclina (Dox) para inducir o no la expresión del transgén H49K respectivamente. La tinción es específica para IF1 humano y tiene un patrón de expresión de expresión citoplasmático granular típico de mitocondrias (sección aumentada a la izquierda). **B:** Western blots de extractos de proteínas hepáticas de ratones dobles transgénicos (T⁺/H⁺) y controles (Ctr) sin (-) o con (+) tratamiento con doxiciclina (Dox) para inducir o no la expresión del transgén H49K respectivamente. **C:** Concentración en sangre de glucosa y lactato en ratones adultos dobles transgénicos (barras naranjas) y controles (barras negras) sin tratamiento con doxiciclina. El histograma representa la media ± S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

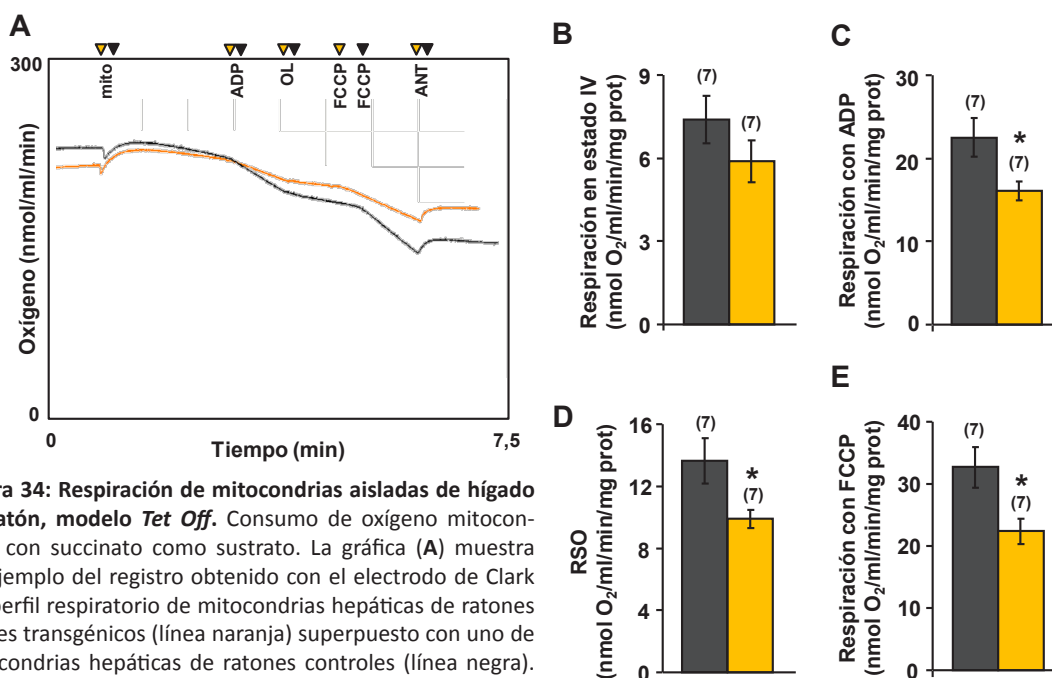


Figura 34: Respiración de mitocondrias aisladas de hígado de ratón, modelo *Tet Off*. Consumo de oxígeno mitocondrial con succinato como sustrato. La gráfica (A) muestra un ejemplo del registro obtenido con el electrodo de Clark del perfil respiratorio de mitocondrias hepáticas de ratones dobles transgénicos (línea naranja) superpuesto con uno de mitocondrias hepáticas de ratones controles (línea negra).

Los histogramas (B-E) representan la media ± S.E.M. de los consumos respiratorios de las mitocondrias dobles transgénicas (barras naranjas) y las mitocondrias control (barras negras) obtenidos en los distintos estados respiratorios. El número de experimentos aparece entre paréntesis encima de cada barra. Estos experimentos se llevaron a cabo sin tratamiento previo de los ratones con doxiciclina. Mitos: Mitocondrias. OL: Oligomicina; ANT: Antimicina; ROT: Rotenona; RSO: Respiración Sensible a Oligomicina; *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

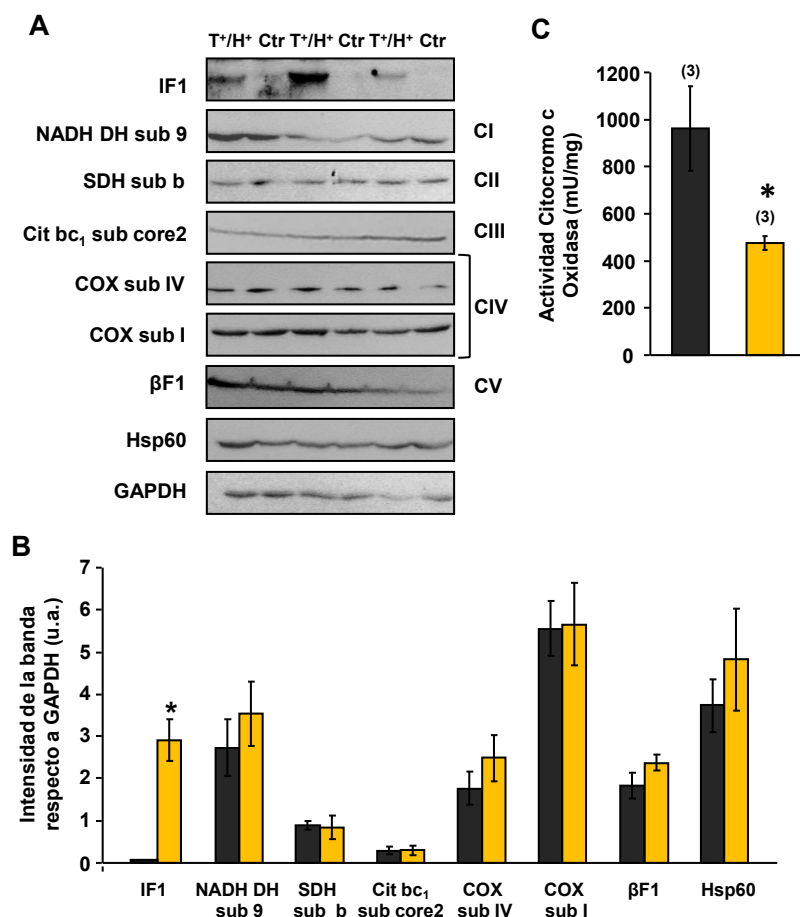


Figura 35: Complejos respiratorios en extractos hepáticos, modelo *Tet Off*. A-B: Niveles proteicos de los distintos complejos respiratorios, IF1, Hsp60 y GAPDH en extractos hepáticos de ratones adultos dobles transgénicos (T⁺/H⁺, barras naranjas) y de ratones control (Ctrl, barras negras) sin tratamiento con doxiciclina. El histograma representa la densitometría de las bandas expresada como la media \pm S.E.M. de la intensidad de la banda respecto a GAPDH de al menos 3 muestras. u.a.: unidades arbitrarias; NADH DH sub 9: subunidad 9 de la NADH deshidrogenasa, (complejo I); SDH sub b: subunidad b de la succinato deshidrogenasa (complejo II); Cit bc₁ sub core2: subunidad *core 2 protein* del complejo citocromo bc₁ (complejo III); COX sub IV y COX sub I: subunidad 4 o 1 respectivamente de la citocromo c oxidasa (complejo IV); βF1: subunidad β de la ATPasa mitocondrial (complejo V). C: Actividad citocromo oxidasa medida en mitocondrias de los mismos ratones dobles transgénicos (barras naranjas) y controles (barras negras). El histograma representa la media \pm S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. *: $p \leq 0,05$ cuando se compara frente a control según la prueba *t* de Student.

4.3.8. Sobre-expresión hepática de H49K y carcinogénesis.

Con objeto de verificar la relevancia de la OXPHOS en progresión tumoral decidimos analizar el efecto de la carcinogénesis inducida químicamente en el modelo de sobre-expresión de H49K en hígado. Para ello, se indujo carcinogénesis hepática con N-dietilnitrosamina (DEN), un potente carcinógeno alquilante de DNA (Verna y cols., 1996) en ratones H49K-*Tet Off* y controles (ver Materiales y Métodos sección 3.5.4). El tratamiento con DEN produjo una disminución significativa en el peso de los animales dobles transgénicos, no así en los controles (Figura 36A). Sin embargo, el hígado de los ratones control y, especialmente, el de los ratones que expresan H49K tratados con DEN muestra un aumento significativo de peso respecto al de los animales tratados con PBS (Figura 36B). Como parámetro bioquímico de afectación hepática medimos los niveles de transaminasas en sangre (Figura 36C-D).

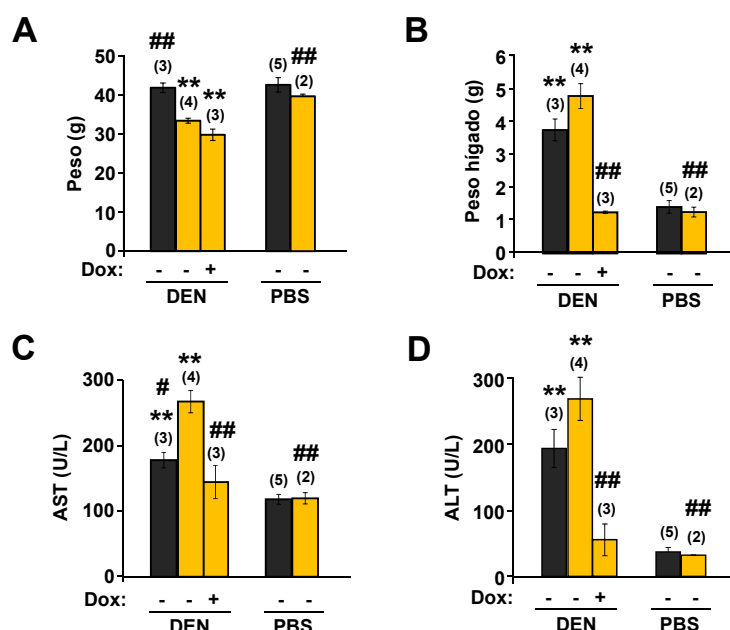
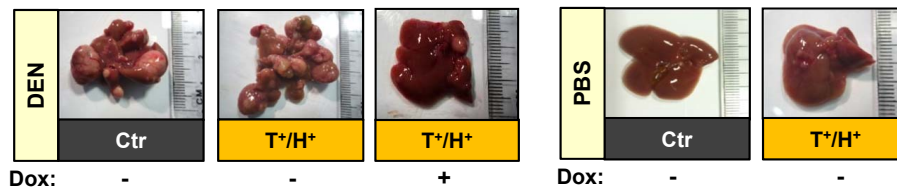


Figura 36: Peso y afectación hepática tras tratamiento con N-dietilnitrosamina (DEN) en el modelo *Tet Off*. Ratones dobles transgénicos (T⁺/H⁺, naranja) y controles (Ctr, negro) de 14 días de edad fueron inyectados intraperitonealmente con 25 µg/g peso de N-dietilnitrosamina (DEN) o con un volumen igual de PBS. A los 11 meses se analizó la presencia de tumores hepáticos. **A-B:** Peso total (**A**) y hepático (**B**) de los animales previo al sacrificio. **C-D:** Niveles de las transaminasas aspartato aminotransferasa (AST, **C**) y alanina aminotransferasa (ALT, **D**) en sangre. Los histogramas representan la media ± S.E.M. del número de muestras indicado entre paréntesis. Estos experimentos se llevaron a cabo con (+) o sin (-) tratamiento previo de los ratones con doxiciclina (Dox) según se indica en las figuras. *: p < 0,05 cuando se compara frente a control tratado con PBS según la prueba t de Student; **: p < 0,01 cuando se compara frente a control tratado con PBS según la prueba t de Student; #: p < 0,01 cuando se compara frente a doble transgénico tratado con DEN (sin doxiciclina) según la prueba t de Student; ##: p < 0,05 cuando se compara frente a doble transgénico tratado con DEN (sin doxiciclina) según la prueba t de Student.

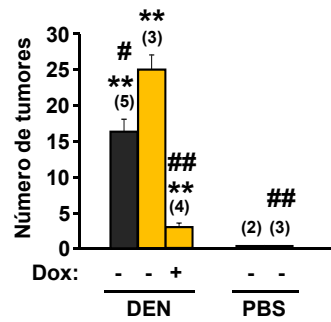
Tanto la aspartato aminotransferasa (AST), como la alanina aminotransferasa (ALT) se encuentran significativamente aumentadas en los ratones tratados con DEN, especialmente en ratones que expresan H49K (Figura 36C-D). En los ratones dobles transgénicos tratados con DEN, el silenciamiento de la expresión de H49K por tratamiento con doxiciclina normalizó el peso hepático y las transaminasas en sangre hasta niveles comparables a los de los animales tratados con PBS (Figura 36B-D). Esta afectación hepática se correlaciona con la presencia de tumores hepáticos en los animales tratados con DEN (Figura 37A-B) no observados en ratones tratados con PBS.

Cabe destacar que el número de tumores presente en ratones que expresan H49K tratados con DEN es significativamente superior al de los controles con el mismo tratamiento (Figura 37A-B), aunque el tamaño de estos es similar en ambos grupos (Figura 37C). De nuevo, el silenciamiento con doxiciclina en los ratones dobles transgénicos tratados con DEN, redujo el número de tumores significativamente (Figura 37A-B). En conjunto, estos resultados sugieren que la sobreexpresión de H49K en hígado acelera la aparición de tumores hepáticos en respuesta a un carcinógeno como el DEN, y que su silenciamiento protege frente a este carcinógeno, lo que refuerza la idea de un papel relevante de IF1 en el proceso tumoral. Resultados posteriores del laboratorio con un número mayor de animales y un protocolo más agresivo de carcinogénesis inducida por DEN han confirmado estos resultados (datos no mostrados).

A



B



C

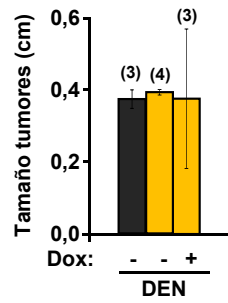


Figura 37: Efecto hepatocarcinogénico de N- dietilnitrosamina (DEN) en el modelo *Tet Off*. Ratones dobles transgénicos (T⁺/H⁺, naranja) y controles (Ctr, negro) de 14 días de edad fueron inyectados intraperitonealmente con 25 µg/g peso de N- dietilnitrosamina (DEN) o con un volumen igual de PBS. A los 11 meses se analizó la presencia de tumores hepáticos. **A:** Imágenes representativas de los hígados de los ratones. **B:** Número de tumores observados macroscópicamente en el hígado de los animales. **C:** Tamaño de los tumores hepáticos encontrados. Estos experimentos se llevaron a cabo con (+) o sin (-) tratamiento previo de los ratones con doxiciclina (Dox) según se indica en las figuras. **: p < 0,01 cuando se compara frente a doble transgénico tratado con DEN según la prueba t de Student; #: p < 0,01 cuando se compara frente a control tratado con DEN (sin doxiciclina) según la prueba t de Student.

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

La proteína IF1 fue descrita en los años 60 como un inhibidor de la actividad hidrolítica de la H⁺-ATP sintasa (Pullman y cols., 1963) y su estructura y bioquímica caracterizada en años posteriores. Sin embargo, poco se sabe del papel que juega IF1 en la fisiología celular más allá de la inhibición de la depleción de ATP en situaciones de hipoxia. Con objeto de desentrañar esta función, hemos analizado los niveles de IF1 en distintos tejidos normales y tumorales, generado un modelo celular de sobre-expresión de IF1 o H49K y caracterizado un modelo animal de sobre-expresión hepática de H49K regulada por doxiciclina. Los resultados de este estudio describen, por primera vez, la capacidad inhibitoria de IF1 sobre la actividad *sintética* de la ATPasa y desvelan una implicación de IF1 en el proceso tumoral.

5.1. IF1 ESTÁ DIFERENCIALMENTE EXPRESADO EN CÉLULAS Y TEJIDOS MURINOS Y HUMANOS

Los anticuerpos específicos contra una determinada proteína son una herramienta imprescindible en el laboratorio y determinan en gran medida la calidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos. Desafortunadamente, los anticuerpos anti-hIF1 disponibles en el mercado no tienen suficiente especificidad (datos no mostrados) por lo que tuvimos que generarlos como paso previo al estudio de la función de IF1. Mediante la técnica de hibridomas, obtuvimos anticuerpos policlonales y monoclonales de elevada especificidad que reconocen la proteína h-IF1 nativa en células y tejidos humanos, tanto en *western blot* (Figura 7C, 8 y 15), como en inmunofluorescencia (Figura 7D) o en inmunohistoquímica (Figura 16). La proteína mutante H49K es igualmente reconocida por los anticuerpos generados (Figura 9, 23 y 33). Sin embargo, los anticuerpos generados anti-hIF1 tienen poca o ninguna afinidad por la proteína homóloga murina (Figura 7C), lo que pone en evidencia su elevada especificidad contra la proteína humana.

Mediante estos anticuerpos, hemos podido demostrar cómo los niveles de expresión de IF1 varían enormemente de unas células a otras (Figura 7C), pudiendo identificar aquellas con niveles bajos de IF1 donde poder estudiar el efecto de la sobre-expresión de IF1 o H49K y aquellas con niveles de IF1 altos donde es más apropiado estudiar el efecto del silenciamiento de IF1. Así mismo, hemos descrito por primera vez la gran variabilidad existente en los niveles de expresión de IF1 que presentan diferentes tejidos humanos normales (Figura 8B-C). Estos resultados sugieren que IF1 podría estar, al igual que la β F1ATPasa (Izquierdo y cols., 1993), diferencialmente expresado según los requerimientos del tejido, configurando el perfil energético de éste. Así, tejidos altamente energéticos como el hígado o el corazón humano tienen niveles elevados de IF1 (Figura 8B-C), posiblemente como mecanismo de protección frente a la depleción de ATP y la consecuente muerte celular ante un eventual estímulo de estrés. Sin embargo, estos niveles elevados de IF1 podrían, según el papel descrito en este estudio, inhibir la OXPHOS por acción de masas y por tanto limitar la disponibilidad de ATP celular en estos tejidos. Por lo tanto, es posible que exista otro mecanismo de regulación post-traducciona l de IF1, además de la conocida regulación por pH (Cabezon y cols.,

2000b), que permita que en tejidos altamente energéticos la elevada concentración de IF1 no inhiba a la H^+ -ATP sintasa. Esta regulación podría tratarse de modificaciones post-traduccionales de IF1 que modulen su afinidad por la ATPasa. En este sentido, Rouslin y cols., han descrito diferencias en el contenido y en afinidad de IF1 por la ATPasa en músculo cardíaco de distintas especies (Rouslin, 1991; Rouslin y cols., 1995; Rouslin y cols., 1996). Animales de bajo número de pulsaciones como los cerdos, conejos o humanos, son menos susceptibles a daño cardíaco porque sus niveles y afinidad de IF1 permiten controlar el gasto de ATP por la ATPasa. Otros animales de alto número de pulsaciones, como la rata y ratón, con un 20-30% menos de IF1, sufren una depleción de ATP más rápida y por tanto están menos protegidos frente a isquemia. Una tercera clase de animales como las cobayas o palomas parecen tener niveles elevados de IF1 pero con una afinidad menor por la ATPasa por lo que la protección frente a isquemia no es tan alta como en el primer grupo (Rouslin y cols., 1995; Rouslin y cols., 1996). Otra posible regulación puede darse por unión de IF1 a otras proteínas que eviten su unión a la ATPasa. Así, se ha descrito la unión de IF1 a otras proteínas de la membrana interna mitocondrial (Lopez-Mediavilla y cols., 1993; Ichikawa y cols., 2002), aunque son necesarios más estudios que demuestren este u otros mecanismos de regulación de la actividad de IF1.

5.2. IF1 INHIBIE LA ACTIVIDAD ATP SINTASA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS

El papel inhibitorio de IF1 sobre la actividad hidrolasa de la H^+ -ATP sintasa en situaciones de hipoxia está bien documentado (Pullman y cols., 1963; Galante y cols., 1981; Cabezon y cols., 2003; Gledhill y cols., 2007). Sin embargo, la inhibición de la actividad ATP sintasa en condiciones no hipóxicas es todavía debatido (Pullman y cols., 1963; Hashimoto y cols., 1990; Walker, 1994; Campanella y cols., 2008; Bason y cols., 2011). No podemos olvidar que las enzimas catalizan reacciones reversibles, por lo que es poco probable que se pueda bloquear un sentido de la reacción sin afectar al otro (Yoshida y cols., 2001). Por eso, puesto que IF1 inhibe la catálisis rotatoria de la H^+ -ATPasa y esta es esencialmente la misma en el sentido de giro de síntesis y de hidrólisis de ATP, es lógico suponer que IF1 pueda inhibir la síntesis y no sólo la hidrólisis de ATP en determinadas circunstancias, como es un aumento en la concentración celular de IF1 que por acción de masas potencie la unión de este inhibidor a la ATPasa.

En este estudio se demuestra, por vez primera, cómo IF1 y su mutante más potente H49K producen una inhibición de la actividad *sintasa* de la H^+ -ATP sintasa en células de rata, ratón y humano ya que su sobre-expresión en líneas con bajo contenido endógeno de IF1 produce una inhibición de la respiración sensible a oligomicina (RSO) y un aumento del flujo glucolítico y del $\Delta\Psi_m$ de manera similar a la oligomicina (Figuras 9, 11 y 13). La disminución de la RSO indica que la ATPasa se encuentra parcialmente inhibida por IF1 y, por tanto, la oligomicina tiene menos efecto inhibitorio. El aumento del flujo glucolítico se produce como consecuencia de la inhibición de la síntesis de ATP mitocondrial con el objetivo de satisfacer, mediante esta ruta, las necesidades

energéticas de la célula. Por último, el aumento del $\Delta\Psi_m$ es coherente con una acumulación de H^+ en el espacio intermembrana por boqueo de su translocación hacia la matriz mitocondrial por la ATPasa. Estos tres hallazgos evidencian de manera inequívoca la inhibición de la actividad sintasa de la ATPasa. Congruentemente, el silenciamiento de IF1 en células con elevado nivel endógeno de IF1 muestra un aumento de la actividad ATP sintasa (RSO) y una disminución del flujo glucolítico (Figura 14). Es importante destacar la importancia del tipo celular elegido para llevar a cabo estos experimentos, ya que la sobre-expresión de IF1 en células de elevado contenido endógeno tiene poco o ningún efecto en el flujo glucolítico (células HeLa, Figura 10) o $\Delta\Psi_m$ (células T47D, Figura 12). Esta es, posiblemente, la causa de la discrepancia de nuestro resultado con los de Campanella y cols., que observan un aumento de la actividad ATP sintasa cuando sobre-expresan IF1 en células HeLa (Campanella y cols., 2008). Sin embargo, estas células, como se puede ver en la Figura 7C presentan un nivel muy elevado de IF1, por lo que vemos muy poco probable la detección de una respuesta fisiológica tras la sobre-expresión de IF1.

En definitiva, aunque el papel inhibitorio de IF1 sobre la actividad hidrolasa de la ATPasa está bien documentado (Pullman y cols., 1963; Galante y cols., 1981; Cabezon y cols., 2003; Gledhill y cols., 2007), no se puede negar que IF1 puede inhibir así mismo la actividad sintasa de la ATPasa. Los resultados de este estudio demuestran que este es el caso cuando se sobre-expresa IF1 o su mutante H49K. Estos resultados *in vitro* han sido, además, corroborados en células de colon (Formentini y cols., 2012), ovario, mama y pulmón (Sanchez-Arago y cols., 2013b) así como *in vivo* en un modelo murino de sobre-expresión de H49K en cerebro (Formentini y cols., 2014). Existen otras evidencias en la literatura que sugieren que IF1 puede inhibir la actividad ATP sintasa de la ATPasa. Así, la expresión de IF1 se relaciona con una baja actividad sintasa de la ATPasa en tumores (Luciakova y cols., 1984; Chernyak y cols., 1991) y en partículas submitocondriales de corazón bovino (Husain y cols., 1983; Lippe y cols., 1988). Además, se sabe desde hace tiempo que el inicio de OXPHOS en respuesta a la reinstauración de fuerza protón motriz pasa por una fase de retardo que corresponde a la liberación de IF1 del complejo IF1-ATPasa (Harris y cols., 1978; Harris y cols., 1979; De Gomez-Puyou y cols., 1980; Lippe y cols., 1988). Más recientemente, la delección de IEX-1 proteína que promueve la degradación de IF1, ha puesto en evidencia la inhibición de la actividad sintasa de la ATPasa *in vivo* (Shen y cols., 2009). La inhibición de la síntesis de ATP por IF1 tiene, incluso, una aplicación industrial. La sobre-expresión inducible de Inh1 (homólogo de IF1 en levaduras) consigue aumentar la producción de piruvato a partir de glucosa en un cultivo de levaduras en un 30% al inhibir la ATP sintasa y aumentar la vía glucolítica en consecuencia (Zhou y cols., 2009).

IF1 se comporta, por tanto, como un regulador metabólico dotando a la célula de un mecanismo adicional para adaptarse a las amplias fluctuaciones fisiológicas en las necesidades energéticas de la célula (Harris y cols., 1991; Das, 2003). En efecto, el rápido recambio de IF1, en torno a 100 min, (Sanchez-Arago y cols., 2013b) apoya este papel, ya que permite una rápida regulación de la OXPHOS para hacer frente a los cambios, también rápidos, en la concentración de ATP.

5.3. IF1-H49K INHIBE LA ACTIVIDAD ATP SINTASA MITOCONDRIAL *IN VIVO*

5.3.1. Modelo animal de inhibición de OXPHOS a través de la sobre-expresión de H49K

Basándonos en la inhibición de la H⁺-ATP sintasa que se produce cuando se sobre-expresa IF1 o su mutante H49K en células, hemos generado un modelo animal que permite estudiar el efecto de estas moléculas en distintos órganos. Así, los ratones transgénicos *tetO-IF1* y *tetO-H49K* permiten una expresión localizada y regulable en el tiempo cuando se cruzan con ratones transgénicos que expresan un transactivador regulado por doxiciclina bajo un promotor específico de tejido (Figura 20).

En este estudio, se analiza el fenotipo de los ratones transgénicos que sobre-expresan H49K en hígado de forma regulada por doxiciclina. La mutación H49K hace que la proteína se encuentre en forma de dímeros activos en cualquier rango de pH (Schnizer y cols., 1996; Cabezon y cols., 2000b), por lo su efecto inhibitorio es más pronunciado que el de IF1, como se ha podido demostrar en células en cultivo (Figuras 9, 11 y 13). Teniendo en cuenta el elevado contenido endógeno de IF1 en hígado (Figura 8A), se decidió emplear el modelo *tet-O-H49K* para interferir la OXPHOS en este tejido. En la versión *On* del modelo en la que la activación de la expresión se produce por tratamiento de los animales con doxiciclina, observamos una expresión hepática de H49K difusa, preferente en regiones perivasculares (Figura 23). La expresión hepática de H49K es suficiente para inhibir la OXPHOS en mitocondrias aisladas (Figura 24) y disminuir el contenido de ATP hepático (Figura 26). Como consecuencia, el sensor energético AMPK se activa (Figura 27) para modular el metabolismo de la célula hacia la producción de energía. Estos efectos demuestran que la sobre-expresión de H49K, es capaz de inhibir la H⁺-ATP sintasa *in vivo*. La sobre-expresión de H49K en cerebro reproduce estos resultados (Formentini y cols., 2014), confirmando la inhibición de la OXPHOS de este modelo.

Sorprendentemente, observamos que la respiración máxima de las mitocondrias hepáticas con sobre-expresión de H49K es inferior a las mitocondrias controles (Figura 24E), confirmando la misma observación en células (Figura 13B) y sugiriendo un defecto secundario en algún complejo respiratorio. Aunque el contenido proteico de los distintos complejos permanece inalterado (Figura 25A-B), observamos una disminución en la actividad de la citocromo c oxidasa (complejo IV) en mitocondrias hepáticas que sobre-expresan H49K (Figura 25C). La citocromo c oxidasa cataliza el paso limitante de la CTE en tejidos como el hígado (Groen y cols., 1982; Arnold, 2012), por lo que está estrechamente regulada por distintos mecanismos como la regulación alostérica por ATP, la modulación de su biogénesis, el ensamblaje de supercomplejos o modificaciones post-translationales [revisado en (Srinivasan y cols., 2012) y (Arnold, 2012)]. Por ejemplo, se han descrito fosforilaciones en la citocromo c oxidasa que inhiben su actividad (Lee y cols., 2005; Prabu y cols., 2006). También se ha descrito que la presencia de alteraciones en la ATPasa de levaduras produce una disminución de la actividad del complejo IV, sin (Saddar y cols., 2008) o con (Rak y cols., 2007) alteración de su contenido. Esta disminución de la actividad del complejo IV se observa también en mitocondrias de neuronas que sobre-expresan H49K (Formentini y cols., 2014). En este caso, la

causa parece hallarse en una deficiencia del complejo IV en su ensamblaje en dímeros y supercomplejos (Formentini y cols., 2014). Independientemente del mecanismo, la inhibición de la actividad de la citocromo c oxidasa permite ajustar el flujo de electrones a la síntesis reducida de ATP en mitocondrias que sobre-expresan H49K para mantener el $\Delta\Psi_m$ y permitir las muchas funciones mitocondriales dependientes de este gradiente (Rak y cols., 2007).

Por otro lado, la inhibición de la ATPasa tiene como consecuencia un aumento de la producción de ROS (Formentini y cols., 2012). En nuestro modelo animal, el bloqueo de la OXPHOS hepática produce posiblemente una señal de ROS moderada suficiente para inducir la expresión de la enzima antioxidante SOD-2 (Figura 31A). La activación de SOD-2 probablemente mitiga la carbonilación de proteínas producida por los ROS en animales que expresan H49K (Figura 32), pero no es suficiente para impedir la inhibición en la actividad del complejo IV (Figura 25C), produciéndose un posible mecanismo de regulación *feed-back* de la CTE mediado por la inhibición de la ATPasa (Formentini y cols., 2014) como se ha descrito en el párrafo anterior.

De manera congruente con el déficit energético que presenta el hígado de los ratones que sobre-expresan H49K (Figuras 24, 26 y 27), se observa una disminución de la glucemia en ratones ayunados (Figura 28), lo cual indica que el hígado de estos ratones tiene parcialmente impedida la gluconeogénesis. Esta ruta biosintética requiere grandes cantidades de energía proveniente, principalmente, de la β -oxidación mitocondrial de los ácidos grasos que han sido movilizados desde el tejido adiposo.

Sin embargo, no se aprecian diferencias significativas en la concentración de acilcarnitinas en sangre (Figura 29). Las acilcarnitinas son un producto intermedio del catabolismo de ácidos grasos que tiene lugar preferentemente en músculo esquelético, corazón, corteza renal e hígado y su presencia en sangre es equivalente a su concentración en el interior de mitocondrias (Millington y cols., 2011). La C3-carnitina se produce en el metabolismo de aminoácidos ramificados. Su aumento ($p < 0,06$) en ratones que sobre-expresan H49K podría estar relacionado con la movilización de estos aminoácidos desde músculo esquelético para ser utilizados como fuente de energía. En efecto, esta posibilidad coincide con un aumento significativo de isoleucina así como de las concentraciones (≈ 10 -15%) de otros aminoácidos esenciales murinos como son la leucina, triptófano, lisina e histidina observado en estos ratones (Tabla 12). Apoyando esta idea, se puede detectar un aumento ($p < 0,06$) en la concentración sanguínea de 1-metilhistidina, marcador de proteólisis de músculo esquelético (Aranibar y cols., 2011).

Es de destacar que los ratones que sobre-expresan H49K en hígado tienen menor piruvato hepático (Figura 30) y menor lactato en sangre (Figura 28) respecto a los controles. Esto sugiere que debido a la limitación en la actividad de la gluconeogénesis, el piruvato que no se está oxidando en el hígado se transforma en lactato, que es excretado a la sangre y utilizado por tejidos extra-hepáticos como el cerebro, corazón o músculo esquelético. Estos tejidos son altamente oxidativos y con necesidades energéticas altas, por lo que, cuando la glucosa es limitada, pueden utilizar lactato como fuente de energía. La alanina sanguínea se encuentra disminuida también en los ra-

tones que expresan H49K en hígado (Tabla 12), por lo que este aminoácido podría estar supliendo la alta demanda de lactato en estos animales mediante su transaminación a piruvato en el hígado. La transformación de piruvato a lactato en el hígado de los ratones que sobre-expresan H49K explicaría también por qué no observamos un aumento en la concentración de ácidos orgánicos en el hígado de estos animales (Figura 30), que, de otro modo, deberían acumularse por una menor actividad de la OXPHOS.

Los resultados principales de inhibición de la actividad de la ATP sintasa obtenidos en el modelo *On* de sobre-expresión condicional de H49K han sido confirmados en el modelo *Off* equivalente (Figuras 33-35), demostrando que el fenotipo observado es independiente del mecanismo de sobre-expresión del transgén.

Los ratones transgénicos *tetO-IF1* y *tetO-H49K* representan el primer modelo experimental murino de regulación de la OXPHOS por inhibición de la H⁺-ATP sintasa, con la ventaja de una expresión tejido-específica y regulada por doxiciclina. Estos ratones permitirán estudiar el efecto de la inhibición de la ATP sintasa mediada por IF1 o H49K en distintos tejidos. Por ejemplo, la expresión selectiva de H49K en cerebro ha demostrado recientemente que la reprogramación metabólica inducida por H49K genera un preconditionamiento de la neurona frente a un daño exocitotóxico (Formentini y cols., 2014), poniendo de manifiesto la importancia de la H⁺-ATP sintasa en la regulación de muerte neuronal y su valor potencial como diana terapéutica en neurodegeneración (Formentini y cols., 2014). Por otro lado, la expresión de estos transgenes en tejidos como el corazón o el músculo esquelético permitirán dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen en las enfermedades raras asociadas a mitocondriopatías por defecto en OXPHOS.

5.3.2. Inhibición de la OXPHOS y cáncer

El cambio metabólico experimentado por los tumores es considerado hoy en día una característica común y necesaria que una célula normal debe adoptar para convertirse en tumoral (Hannahan y cols., 2011) (Figura 3). El aumento del flujo glucolítico es uno de los componentes de este cambio metabólico ampliamente reconocido, pero también la inhibición de la OXPHOS participa en la configuración de la reprogramación metabólica que sucede en cáncer según el conocido efecto Warburg [revisado en (Cuezva y cols., 2009; Sanchez-Arago y cols., 2013a)]. Además, la mitocondria y la OXPHOS en particular, es necesaria para ejecutar el programa de muerte celular (Reed, 1997; Green, 1998; Kroemer y cols., 1998; Ravagnan y cols., 2002; Jaattela, 2004). Así, el proceso de generación de energía y el de muerte celular están funcional y molecularmente integrados (Formentini y cols., 2012). Por ejemplo, proteínas con una importante función en la señalización de la muerte celular como, p53, citocromo c o AIF intervienen en el metabolismo energético mitocondrial y, por tanto, en la OXPHOS (Plas y cols., 2002; Vahsen y cols., 2004; Zhang y cols., 2011). Además, la formación del apoptosoma requiere niveles altos de ATP (Green y cols., 1998), principal producto de la OXPHOS y los ROS, generados principalmente en la CTE, también participan en la señalización de muerte celular si los niveles son elevados o en la proliferación si

son moderados (Orrenius y cols., 2007; Formentini y cols., 2012). La H⁺-ATP sintasa forma parte también de esta integración entre producción energética y muerte celular de la mitocondria. Por ejemplo, se ha descrito que la proteína anti-apoptótica Bcl-xL interacciona con β F1ATPasa (Alavian y cols., 2011; Formentini y cols., 2014) aumentando su actividad y la proteína Bax necesita la H⁺-ATP sintasa para ejercer su función proapoptótica (Matsuyama y cols., 1998). Recientemente se ha sugerido que el PTP está formado por dímeros de H⁺-ATPasa (Giorgio y cols., 2013) y que las subunidades c de la misma son necesarias para la apertura del canal (Bonora y cols., 2013). Por tanto, la H⁺-ATP sintasa es especialmente necesaria para la eficiente ejecución de la apoptosis (Matsuyama y cols., 1998; Santamaria y cols., 2006). Así, se ha demostrado que una inhibición de la actividad de esta enzima con oligomicina impide la ejecución de la muerte celular inducida con estaurosporina al impedir la hiperpolarización y el aumento de ROS (Santamaria y cols., 2006) y que las células son más susceptibles a este tipo de muerte cuanto más dependientes son de la OXPHOS (Dey y cols., 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004; Santamaria y cols., 2006).

Por todo ello, existen amplias evidencias que indican que la progresión tumoral requiere una actividad bioenergética mitocondrial reprimida [revisado en (Cuezva y cols., 2009; Sanchez-Arago y cols., 2013a)]. Un ejemplo de ello es la disminución en respiración mitocondrial (y aumento de glucólisis) que exhiben las células transformadas H-RasV12/E1A cuanto mayor es su potencial tumorigénico (de Groof y cols., 2009) o la supresión de la biogénesis mitocondrial (y aumento en glucólisis) que acompaña a la capacidad invasiva de los gliomas (Keunen y cols., 2011). Además, existen varios modelos que prueban la relación entre la disfunción mitocondrial y el proceso tumoral (ver sección 1.1.3 en Introducción). Por otro lado, la mayoría de los tumores muestran una disminución de los niveles de expresión β F1ATPasa junto con un aumento de la expresión de enzimas glucolíticas (Cuezva y cols., 2002; Unwin y cols., 2003; Cuezva y cols., 2004; Chen y cols., 2004b; He y cols., 2004; Bi y cols., 2006; Lin y cols., 2008; Li y cols., 2010b; Xiao y cols., 2013). Además, se ha demostrado que tumores de diferentes tejidos o tipos histológicos tienen la misma huella bioenergética (Acebo y cols., 2009) habiéndose demostrado que es un marcador pronóstico y un marcador predictivo de la respuesta a quimioterapia (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004; Isidoro y cols., 2005; Lopez-Rios y cols., 2007; Lin y cols., 2008; Hernlund y cols., 2009; Sanchez-Arago y cols., 2011; Hjerpe y cols., 2013; Xiao y cols., 2013).

La sobre-expresión de H49K en hígado inhibe la OXPHOS (ver apartado 5.3.1 de esta Discusión) mimetizando este fenotipo tumoral. En efecto, los resultados de este estudio en ratones muestran que H49K promueve el desarrollo de tumores *in vivo* en presencia de un agente hepatocarcinogénico (DEN). Así, los ratones que sobre-expresan H49K sufren una afectación hepática mayor al ser tratados con DEN (Figura 36) y generan un mayor número de tumores (Figura 37). El tamaño de los tumores generados es similar en todos los ratones expuestos al DEN, expresen o no H49K (Figura 37 C), luego H49K favorece la transformación celular más que la progresión/proliferación. Cuando en estos ratones se suprime la expresión de H49K por tratamiento con doxiciclina, el fenotipo revierte hasta ser similar al obtenido en ratones tratados con PBS, lo que pone de manifiesto que la doxiciclina, además de la supresión de la expresión de H49K tiene un efecto an-

ticarcinogénico (Fife y cols., 1995; Son y cols., 2009). Es necesario confirmar estos resultados preliminares en experimentos que impliquen a mayor número de animales y diferentes condiciones (animales tratados con PBS + doxiciclina), pero estos datos señalan, una vez más, la importancia de la actividad de la H^+ -ATP sintasa en la protección frente a estímulos tóxicos. En este sentido, la neuronas de ratones que sobre-expresan H49K en cerebro presentan también menor daño cerebral tras la inyección de ácido quinolínico gracias a una reducción de la muerte celular mediada por ROS (Formentini y cols., 2014).

5.3.3. Papel de IF1 en cáncer

Actualmente se conocen dos mecanismos independientes que explican la ampliamente evidenciada reducción en la expresión de $\beta F1ATPasa$ (Cuezva y cols., 2002; Cuezva y cols., 2004). A nivel transcripcional, la hipermetilación del gen que codifica para la $\beta F1ATPasa$ (*ATP5B*) limita la expresión de la proteína en células de leucemia mieloide crónica (Li y cols., 2010a). A nivel traducional, la proteína G3BP (Ortega y cols., 2010) o miR-127-5p (Willers y cols., 2012) interaccionan con el 3'-UTR de β -mRNA reprimiendo su reclutamiento a polisomas y por tanto su traducción. De esta forma, IF1, al inhibir la H^+ -ATP sintasa como se demuestra en este trabajo (ver sección 5.2 de esta Discusión), representa un tercer mecanismo de regulación, en este caso, de la actividad de la β -F1ATPasa (Figura 38). Por tanto, IF1 puede estar contribuyendo al cambio metabólico experimentado por los tumores.

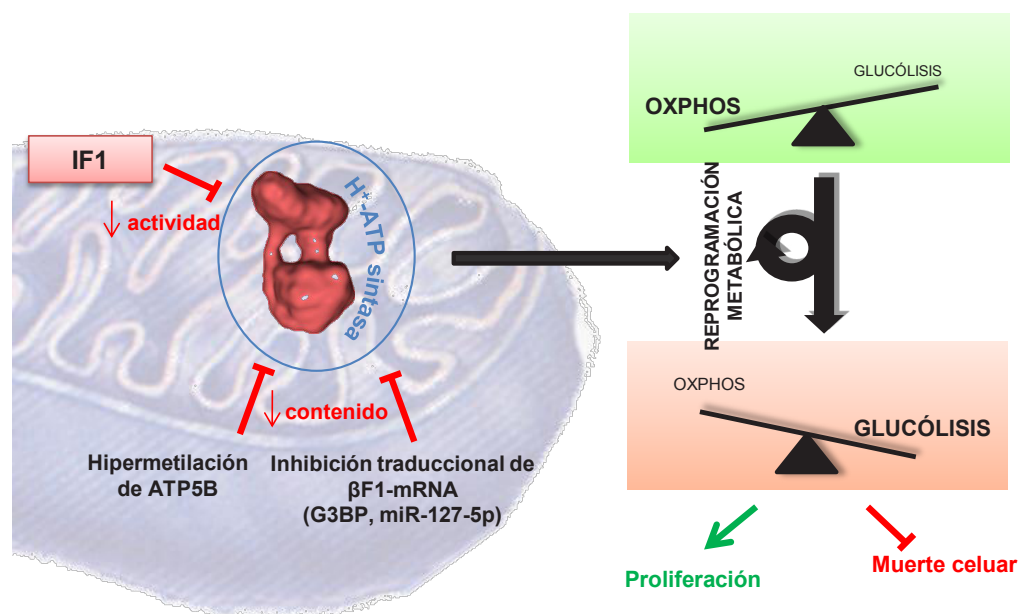


Figura 38: IF1 es un regulador del metabolismo energético celular. Esquema que resume los mecanismos conocidos de inhibición de la H^+ -ATP sintasa en cáncer: la disminución de su contenido por inhibición transcripcional o traduccional y la inhibición de su actividad enzimática por IF1. Estos mecanismos promueven un cambio en el metabolismo energético celular desde un perfil mitocondrial oxidativo (verde) a un perfil glucolítico (rojo) y por tanto, contribuyen a la reprogramación metabólica conocida como efecto Warburg. La adquisición de este fenotipo Warburg ofrece ventajas a la célula tumoral como la proliferación y la evasión a muerte celular.

Dada la importancia de la mitocondria y, especialmente, de la H^+ -ATPasa en la correcta ejecución de la muerte celular, no es sorprendente que IF1 participe en este proceso. Así, IF1 disminuye la autofagia en células HeLa tratadas con H_2O_2 o rapamicina regulando la compartimentación de LC3 hacia autofagosomas (Campanella y cols., 2009). También evita la muerte apoptótica en células de distinto origen tras ser tratadas con estaurosporina mediante un mecanismo de señalización retrógrada al núcleo mediado por ROS que en algunos casos implica la vía de NF κ B (Formentini y cols., 2012; Sanchez-Arago y cols., 2013b). También se ha descrito que IF1 puede evadir la apoptosis impidiendo la remodelación de las crestas mitocondriales (Faccenda y cols., 2013). Además, la señalización de ROS por la sobre-expresión de IF1 promueve la proliferación celular (Formentini y cols., 2014). Por lo tanto, IF1 permite la adquisición de tres de las características fundamentales de la célula tumoral i) el cambio metabólico; ii) la evasión a muerte celular y iii) el aumento de la proliferación (Figura 38).

Como confirmación del papel de IF1 en cáncer encontramos que los tumores humanos más prevalentes (mama, colon y pulmón) muestran un contenido en IF1 considerablemente más elevado que los tejidos normales correspondientes, tanto en *western blot* (Figura 15) como en inmunohistoquímica (Figura 16). Esta sobre-expresión podría ser causada por las condiciones hipóxicas del tumor, por mutaciones en genes del cáncer o por otros eventos epigenéticos del microambiente tumoral, por ejemplo, aunque el mecanismo mediante el cual las células tumorales aumentan la expresión de IF1 es desconocido por el momento.

No sólo la expresión de IF1 está aumentada en tumores, también su nivel de expresión representa un marcador pronóstico en cáncer de mama. Estudios previos han demostrado la existencia de un marcado cambio hacia un fenotipo glucolítico en este tipo de tumores (Isidoro y cols., 2005) reflejado en un aumento de enzimas glucolíticas y una profunda disminución de la razón β F1/hsp60 y β F1/hsp60/GAPDH (índice BEC). Este fenotipo permite discriminar muestras normales de tumorales con una elevada sensibilidad y está asociado a la progresión de la enfermedad (Isidoro y cols., 2005). En una cohorte de 93 pacientes con cáncer de mama el nivel de IF1 correlaciona inversamente con el BEC, sugiriendo la participación de IF1 en la adquisición de la particular huella bioenergética tumoral. En este estudio se pone de manifiesto que una baja expresión de IF1 implica un riesgo dos veces mayor de presentar metástasis (Tabla 6) y una disminución de la supervivencia libre de enfermedad (Figura 17) en particular en pacientes con marcadores tanto de buen como de mal pronóstico (Tablas 7 y 8). Además, el análisis de la expresión de IF1 y el BEC permite discriminar a un grupo de pacientes con un BEC bajo y una baja expresión de IF1 que presentan una menor supervivencia libre de enfermedad y mayor proporción de metástasis (Figura 18). Es decir, la baja expresión de IF1 junto con el marcador de mal pronóstico BEC bajo (Isidoro y cols., 2005), detecta un grupo de tumores con una elevada probabilidad de metastatizar. Por último IF1 es, junto con el número de nódulos y el nivel de expresión de GAPDH un marcador pronóstico independiente con potencial utilidad clínica (Tabla 9). Se han obtenido resultados similares en muestras de cáncer de colon mediante la técnica de *microarrays*, en la que se demuestra que un

nivel bajo de expresión de IF1 correlaciona con una menor supervivencia global (Sanchez-Arago y cols., 2013b).

Estos resultados pueden ser sorprendentes dada la elevada expresión de IF1 presente en distintos tejidos tumorales (Figura 15 y 16) y al carácter oncogénico de IF1 (Sanchez-Arago y cols., 2012). Existen otros ejemplos en la literatura igualmente paradójicos. Por ejemplo, miR-200s modula la respuesta a estrés oxidativo y produce incremento del crecimiento tumoral en ratones (Mateescu y cols., 2011). Sin embargo, un elevado nivel de miR-200s correlaciona con un buen pronóstico (Hu y cols., 2009) y una baja expresión está asociada a recidiva en pacientes con cáncer de ovario (Marchini y cols., 2011). De igual forma, existe una asociación entre mutaciones en el gen de la isocitrato deshidrogenasa (frecuentemente encontradas en diversos tumores cerebrales y en leucemia) y mayor supervivencia en pacientes con glioblastoma multiforme (Parsons y cols., 2008).

La correlación entre una baja expresión de IF1 y una menor supervivencia libre de enfermedad implica que las células con poca expresión de IF1 pueden metastatizar más fácilmente. Puesto que IF1 correlaciona inversamente con el BEC, las células con IF1 alto y por tanto BEC bajo pueden ser más fácilmente detectadas por el sistema inmune (Hanahan y cols., 2011) o más vulnerables al estrés durante la migración. De hecho, las células con un bajo BEC son más sensibles a la privación de glucosa y a la inhibición de la glucólisis (Isidoro y cols., 2004; Sanchez-Arago y cols., 2011). Sin embargo, las células que, habiendo conseguido la transformación tumoral minimizan la expresión de IF1 podrían invadir tejidos más fácilmente. En cualquier caso, son necesarios estudios adicionales que prueben la causa de esta asociación.

A la vista de estos resultados, los anticuerpos monoclonales de elevada especificidad contra IF1 humano prometen ser una herramienta para generar aplicaciones de diagnóstico como *microarrays* que evalúen el perfil proteómico de un tumor y que permitan correlacionar este perfil con un pronóstico e incluso una terapia personalizada (Aldea y cols., 2011).

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. IF1 se configura como un regulador del metabolismo energético celular que, por su sobre-expresión en determinados tejidos y la capacidad de inhibir la actividad sintasa de la H⁺-ATP sintasa limita la disponibilidad del ATP celular e induce un aumento del flujo glucolítico.
2. IF1 presenta unos niveles de expresión muy variables según el tipo celular o el tejido. Además, IF1 está sobre-expresado en carcinomas humanos de mama, colon y pulmón sugiriendo la enorme relevancia de esta proteína en la adquisición del fenotipo metabólico propio del cáncer. Así mismo, IF1 es un marcador independiente de progresión del cáncer de mama.
3. Se han generado ratones transgénicos *tetO-IF1* y *tetO-H49K* que permiten estudiar el efecto de la inhibición de la H⁺-ATP sintasa mediada por IF1 o H49K de forma tejido-específica y regulada por doxiciclina. Estos ratones son una herramienta muy útil para el estudio de enfermedades donde la represión de la OXPHOS juega un papel relevante en la patología, como es el caso del cáncer u otras enfermedades mitocondriales que cursan con defectos secundarios en la funcionalidad de la H⁺-ATP sintasa.
4. La sobre-expresión hepática de H49K en los modelos murinos Tet *On* y Tet *Off* demuestra que IF1-H49K inhibe la actividad sintasa de la H⁺-ATP sintasa *in vivo* ofreciendo un sistema experimental de valor incuestionable para el análisis molecular y funcional de la implicación de la H⁺-ATP sintasa en muerte celular.
5. La sobre-expresión hepática de H49K en ratones favorece el desarrollo de tumores *in vivo* aportando nuevas evidencias de la implicación de una alteración de la OXPHOS mitocondrial en la progresión del cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Acebo, P., D. Giner, P. Calvo, A. Blanco-Rivero, A. D. Ortega, P. L. Fernandez, G. Roncador, E. Fernandez-Malave, M. Chamorro y J. M. Cuezva (2009). Cancer abolishes the tissue type-specific differences in the phenotype of energetic metabolism. *Transl Oncol* 2(3): 138-145.
- Acin-Perez, R. y J. A. Enriquez (2013). The function of the respiratory supercomplexes: The plasticity model. *Biochim Biophys Acta*.
- Acin-Perez, R., P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Perez-Martos y J. A. Enriquez (2008). Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 32(4): 529-539.
- Adachi, K., K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida y K. Kinosita, Jr. (2007). Coupling of rotation and catalysis in F(1)-ATPase revealed by single-molecule imaging and manipulation. *Cell* 130(2): 309-321.
- Ahn, B. H., H. S. Kim, S. Song, I. H. Lee, J. Liu, A. Vassilopoulos, C. X. Deng y T. Finkel (2008). A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(38): 14447-14452.
- Alavian, K. N., H. Li, L. Collis, L. Bonanni, L. Zeng, S. Sacchetti, E. Lazrove, P. Nabili, B. Flaherty, M. Graham, Y. Chen, S. M. Messerli, M. A. Mariggio, C. Rahner, E. McNay, G. C. Shore, P. J. Smith, J. M. Hardwick y E. A. Jonas (2011). Bcl-x(L) regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F(1)F(O) ATP synthase. *Nat Cell Biol* 13(10): 1224-1233.
- Alberts, B. J., Alexander; Lewis, Julian ; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter Peter (2002). "Molecular Biology of the Cell" New York, Garland Science.
- Aldea, M., J. Clofent, C. Nunez de Arenas, M. Chamorro, M. Velasco, J. R. Berrendero, C. Navarro y J. M. Cuezva (2011). Reverse phase protein microarrays quantify and validate the bioenergetic signature as biomarker in colorectal cancer. *Cancer Lett* 311(2): 210-218.
- Alexeyev, M. F. (2009). Is there more to aging than mitochondrial DNA and reactive oxygen species? *FEBS J* 276(20): 5768-5787.
- Allen, R. D., C. C. Schroeder y A. K. Fok (1989). An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J Cell Biol* 108(6): 2233-2240.
- Allue, I., O. Gandelman, E. Dementieva, N. Ugarova y P. Cobbold (1996). Evidence for rapid consumption of millimolar concentrations of cytoplasmic ATP during rigor-contraction of metabolically compromised single cardiomyocytes. *Biochem J* 319 (Pt 2): 463-469.
- Amuthan, G., G. Biswas, H. K. Ananadatheerthavarada, C. Vijayarathy, H. M. Shephard y N. G. Avadhani (2002). Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* 21(51): 7839-7849.

- Amuthan, G., G. Biswas, S. Y. Zhang, A. Klein-Szanto, C. Vijayasarathy y N. G. Avadhani** (2001). Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion. *EMBO J* 20(8): 1910-1920.
- Ando, C. y N. Ichikawa** (2008). Glutamic acid in the inhibitory site of mitochondrial ATPase inhibitor, IF(1), participates in pH sensing in both mammals and yeast. *J Biochem* 144(4): 547-553.
- Andreyev, A. Y., Y. E. Kushnareva y A. A. Starkov** (2005). Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc)* 70(2): 200-214.
- Andrianaivomananjaona, T., M. Moune-Dimala, S. Herga, V. David y F. Haraux** (2011). How the N-terminal extremity of *Saccharomyces cerevisiae* IF1 interacts with ATP synthase: a kinetic approach. *Biochim Biophys Acta* 1807(2): 197-204.
- Aranibar, N., J. D. Vassallo, J. Rathmacher, S. Stryker, Y. Zhang, J. Dai, E. B. Janovitz, D. Robertson, M. Reily, L. Lowe-Krentz y L. Lehman-McKeeman** (2011). Identification of 1- and 3-methylhistidine as biomarkers of skeletal muscle toxicity by nuclear magnetic resonance-based metabolic profiling. *Anal Biochem* 410(1): 84-91.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart y H. Schagger** (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* 17(24): 7170-7178.
- Arnold, S.** (2012). The power of life--cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and survival. *Mitochondrion* 12(1): 46-56.
- Ashcroft, F. M., D. E. Harrison y S. J. Ashcroft** (1984). Glucose induces closure of single potassium channels in isolated rat pancreatic beta-cells. *Nature* 312(5993): 446-448.
- Baggetto, L. G.** (1992). Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. *Biochimie* 74(11): 959-974.
- Banerjee, A., W. G. Linscheer, H. Chiji, U. K. Murthy, C. Cho, J. Nandi y S. H. Chan** (1998). Induction of an ATPase inhibitor protein by propylthiouracil and protection against paracetamol (acetaminophen) hepatotoxicity in the rat. *Br J Pharmacol* 124(6): 1041-1047.
- Bason, J. V., M. J. Runswick, I. M. Fearnley y J. E. Walker** (2011). Binding of the inhibitor protein IF(1) to bovine F(1)-ATPase. *J Mol Biol* 406(3): 443-453.
- Baughman, J. M., F. Perocchi, H. S. Girgis, M. Plovanich, C. A. Belcher-Timme, Y. Sancak, X. R. Bao, L. Strittmatter, O. Goldberger, R. L. Bogorad, V. Kotliansky y V. K. Mootha** (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476(7360): 341-345.
- Befroy, D. E., K. F. Petersen, S. Dufour, G. F. Mason, R. A. de Graaf, D. L. Rothman y G. I. Shulman** (2007). Impaired mitochondrial substrate oxidation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic patients. *Diabetes* 56(5): 1376-1381.

- Belogradov, G. I.** (2009). Recent advances in structure-functional studies of mitochondrial factor B. *J Bioenerg Biomembr* 41(2): 137-143.
- Benard, G., N. Bellance, D. James, P. Parrone, H. Fernandez, T. Letellier y R. Rossignol** (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 120(Pt 5): 838-848.
- Benit, P., S. Goncalves, E. P. Dassa, J. J. Briere y P. Rustin** (2008). The variability of the harlequin mouse phenotype resembles that of human mitochondrial-complex I-deficiency syndromes. *PLoS One* 3(9): e3208.
- Bergmeyer, H. U., E. Bernt, F. Schmidt y H. Stork** (1974). "D-Glucose. Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase." H. U. Bergmeyer *Bergmeyer: Methods of Enzymatic Analysis Series* New York, Accademic Press.
- Bi, X., Q. Lin, T. W. Foo, S. Joshi, T. You, H. M. Shen, C. N. Ong, P. Y. Cheah, K. W. Eu y C. L. Hew** (2006). Proteomic analysis of colorectal cancer reveals alterations in metabolic pathways: mechanism of tumorigenesis. *Mol Cell Proteomics* 5(6): 1119-1130.
- Bisetto, E., M. Comelli, A. M. Salzano, P. Picotti, A. Scaloni, G. Lippe y I. Mavelli** (2013). Proteomic analysis of F1F0-ATP synthase super-assembly in mitochondria of cardiomyoblasts undergoing differentiation to the cardiac lineage. *Biochim Biophys Acta* 1827(7): 807-816.
- Boekema, E. J. y H. P. Braun** (2007). Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 282(1): 1-4.
- Boerries, M., P. Most, J. R. Gledhill, J. E. Walker, H. A. Katus, W. J. Koch, U. Aebi y C. A. Schoenenberger** (2007). Ca²⁺ -dependent interaction of S100A1 with F1-ATPase leads to an increased ATP content in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 27(12): 4365-4373.
- Boitier, E., R. Rea y M. R. Duchen** (1999). Mitochondria exert a negative feedback on the propagation of intracellular Ca²⁺ waves in rat cortical astrocytes. *J Cell Biol* 145(4): 795-808.
- Bonora, M., A. Bononi, E. De Marchi, C. Giorgi, M. Lebieczinska, S. Marchi, S. Patergnani, A. Rimessi, J. M. Suski, A. Wojtala, M. R. Wieckowski, G. Kroemer, L. Galluzzi y P. Pinton** (2013). Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle* 12(4): 674-683.
- Bosetti, F., F. Brizzi, S. Barogi, M. Mancuso, G. Siciliano, E. A. Tendi, L. Murri, S. I. Rapoport y G. Solaini** (2002). Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 23(3): 371-376.
- Boyer, P. D.** (1975). A model for conformational coupling of membrane potential and proton translocation to ATP synthesis and to active transport. *FEBS Lett* 58(1): 1-6.
- Boyer, P. D.** (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66: 717-749.

- Boyle, G. M., X. Roucou, P. Nagley, R. J. Devenish y M. Prescott** (1999). Identification of subunit g of yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase. *Eur J Biochem* 262(2): 315-323.
- Brand, K. A. y U. Hermfisse** (1997). Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J.* 11(5): 388-395.
- Brandon, M., P. Baldi y D. C. Wallace** (2006). Mitochondrial mutations in cancer. *Oncogene* 25(34): 4647-4662.
- Bravo, C., F. Minauro-Sanmiguel, E. Morales-Rios, J. S. Rodriguez-Zavala y J. J. Garcia** (2004). Overexpression of the inhibitor protein IF(1) in AS-30D hepatoma produces a higher association with mitochondrial F(1)F(0) ATP synthase compared to normal rat liver: functional and cross-linking studies. *J Bioenerg Biomembr* 36(3): 257-264.
- Browne, S. E., A. C. Bowling, U. MacGarvey, M. J. Baik, S. C. Berger, M. M. Muqit, E. D. Bird y M. F. Beal** (1997). Oxidative damage and metabolic dysfunction in Huntington's disease: selective vulnerability of the basal ganglia. *Ann Neurol* 41(5): 646-653.
- Bultema, J. B., H. P. Braun, E. J. Boekema y R. Kouril** (2009). Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato. *Biochim Biophys Acta* 1787(1): 60-67.
- Burwick, N. R., M. L. Wahl, J. Fang, Z. Zhong, T. L. Moser, B. Li, R. A. Capaldi, D. J. Kenan y S. V. Pizzo** (2005). An Inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *J Biol Chem* 280(3): 1740-1745.
- Cabazon, E., I. Arechaga, P. Jonathan, G. Butler y J. E. Walker** (2000a). Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1. *J Biol Chem* 275(37): 28353-28355.
- Cabazon, E., P. J. Butler, M. J. Runswick, R. J. Carbajo y J. E. Walker** (2002). Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J Biol Chem* 277(44): 41334-41341.
- Cabazon, E., P. J. Butler, M. J. Runswick y J. E. Walker** (2000b). Modulation of the oligomerization state of the bovine F1-ATPase inhibitor protein, IF1, by pH. *J Biol Chem* 275(33): 25460-25464.
- Cabazon, E., M. G. Montgomery, A. G. Leslie y J. E. Walker** (2003). The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol* 10(9): 744-750.
- Cabazon, E., M. J. Runswick, A. G. Leslie y J. E. Walker** (2001). The structure of bovine IF(1), the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *Embo J* 20(24): 6990-6996.
- Campanella, M., E. Casswell, S. Chong, Z. Farah, M. R. Wieckowski, A. Y. Abramov, A. Tinker y M. R. Duchon** (2008). Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab* 8(1): 13-25.

- Campanella, M., A. Seraphim, R. Abeti, E. Casswell, P. Echave y M. R. Duchen** (2009). IF1, the endogenous regulator of the F(1)F(o)-ATP synthase, defines mitochondrial volume fraction in HeLa cells by regulating autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1787(5): 393-401.
- Canevari, L., J. B. Clark y T. E. Bates** (1999). beta-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Lett* 457(1): 131-134.
- Carrozzo, R., J. Murray, F. M. Santorelli y R. A. Capaldi** (2000). The T9176G mutation of human mtDNA gives a fully assembled but inactive ATP synthase when modeled in Escherichia coli. *FEBS Lett* 486(3): 297-299.
- Carrozzo, R., A. Tessa, M. E. Vazquez-Memije, F. Piemonte, C. Patrono, A. Malandrini, C. Dionisi-Vici, L. Vilarinho, M. Villanova, H. Schagger, A. Federico, E. Bertini y F. M. Santorelli** (2001). The T9176G mtDNA mutation severely affects ATP production and results in Leigh syndrome. *Neurology* 56(5): 687-690.
- Celotto, A. M., W. K. Chiu, W. Van Voorhies y M. J. Palladino** (2011). Modes of metabolic compensation during mitochondrial disease using the Drosophila model of ATP6 dysfunction. *PLoS One* 6(10): e25823.
- Celotto, A. M., A. C. Frank, S. W. McGrath, T. Fergestad, W. A. Van Voorhies, K. F. Buttle, C. A. Mannella y M. J. Palladino** (2006). Mitochondrial encephalomyopathy in Drosophila. *J Neurosci* 26(3): 810-820.
- Cintrón, N. M. y P. L. Pedersen** (1979). A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. Purification and characterization. *J Biol Chem* 254(9): 3439-3443.
- Clapham, D. E.** (2007). Calcium signaling. *Cell* 131(6): 1047-1058.
- Cogliati, S., C. Frezza, M. E. Soriano, T. Varanita, R. Quintana-Cabrera, M. Corrado, S. Cipolat, V. Costa, A. Casarin, L. C. Gomes, E. Perales-Clemente, L. Salviati, P. Fernandez-Silva, J. A. Enriquez y L. Scorrano** (2013). Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* 155(1): 160-171.
- Contessi, S., M. Comelli, S. Cmet, G. Lippe y I. Mavelli** (2007). IF1 distribution in HepG2 cells in relation to ecto-F(0)F(1)ATP synthase and calmodulin. *J Bioenerg Biomembr* 39(4): 291-300.
- Contessi, S., F. Haraux, I. Mavelli y G. Lippe** (2005). Identification of a conserved calmodulin-binding motif in the sequence of FOF1 ATP synthase inhibitor protein. *J Bioenerg Biomembr* 37(5): 317-326.
- Contessi, S., G. Metelli, I. Mavelli y G. Lippe** (2004). Diazoxide affects the IF1 inhibitor protein binding to F1 sector of beef heart FOF1ATP synthase. *Biochem Pharmacol* 67(10): 1843-1851.

- Contreras, L., I. Drago, E. Zampese y T. Pozzan** (2010). Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta* 1797(6-7): 607-618.
- Copeland, W. C.** (2008). Inherited mitochondrial diseases of DNA replication. *Annu Rev Med* 59: 131-146.
- Corvest, V., C. Sigalat, R. Venard, P. Falson, D. M. Mueller y F. Haraux** (2005). The binding mechanism of the yeast F1-ATPase inhibitory peptide: role of catalytic intermediates and enzyme turnover. *J Biol Chem* 280(11): 9927-9936.
- Coskun, P., J. Wyrembak, S. E. Schriener, H. W. Chen, C. Marciniack, F. Laferla y D. C. Wallace** (2012). A mitochondrial etiology of Alzheimer and Parkinson disease. *Biochim Biophys Acta* 1820(5): 553-564.
- Crunkhorn, S., F. Dearie, C. Mantzoros, H. Gami, W. S. da Silva, D. Espinoza, R. Faucette, K. Barry, A. C. Bianco y M. E. Patti** (2007). Peroxisome proliferator activator receptor gamma coactivator-1 expression is reduced in obesity: potential pathogenic role of saturated fatty acids and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* 282(21): 15439-15450.
- Cuezva, J. M., G. Chen, A. M. Alonso, A. Isidoro, D. E. Misek, S. M. Hanash y D. G. Beer** (2004). The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis. *Carcinogenesis* 25(7): 1157-1163.
- Cuezva, J. M., M. Krajewska, M. L. de Heredia, S. Krajewski, G. Santamaria, H. Kim, J. M. Zapata, H. Marusawa, M. Chamorro y J. C. Reed** (2002). The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res* 62(22): 6674-6681.
- Cuezva, J. M., A. D. Ortega, I. Willers, L. Sanchez-Cenizo, M. Aldea y M. Sanchez-Arago** (2009). The tumor suppressor function of mitochondria: translation into the clinics. *Biochim Biophys Acta* 1792(12): 1145-1158.
- Cuezva, J. M., L. K. Ostronoff, J. Ricart, M. Lopez de Heredia, C. M. Di Liegro y J. M. Izquierdo** (1997). Mitochondrial biogenesis in the liver during development and oncogenesis. *J Bioenerg Biomembr* 29(4): 365-377.
- Cuezva, J. M., M. Sanchez-Arago, S. Sala, A. Blanco-Rivero y A. D. Ortega** (2007). A message emerging from development: the repression of mitochondrial beta-F1-ATPase expression in cancer. *J Bioenerg Biomembr* 39(3): 259-265.
- Chandra, J., A. Samali y S. Orrenius** (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29(3-4): 323-333.
- Chandrasekaran, K., K. Hatanpaa, S. I. Rapoport y D. R. Brady** (1997). Decreased expression of nuclear and mitochondrial DNA-encoded genes of oxidative phosphorylation in association neocortex in Alzheimer disease. *Brain Res Mol Brain Res* 44(1): 99-104.
- Chen, B., L. Liu, A. Castonguay, R. R. Maronpot, M. W. Anderson y M. You** (1993). Dose-dependent ras mutation spectra in N-nitrosodiethylamine induced mouse liver tumors and

- 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced mouse lung tumors. *Carcinogenesis* 14(8): 1603-1608.
- Chen, C., Y. Ko, M. Delannoy, S. J. Ludtke, W. Chiu y P. L. Pedersen** (2004a). Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP. *J Biol Chem* 279(30): 31761-31768.
- Chen, C. T., Y. R. Shih, T. K. Kuo, O. K. Lee y Y. H. Wei** (2008). Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26(4): 960-968.
- Chen, J., T. Kahne, C. Rocken, T. Gotze, J. Yu, J. J. Sung, M. Chen, P. Hu, P. Malfertheiner y M. P. Ebert** (2004b). Proteome analysis of gastric cancer metastasis by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of metastasis-related proteins. *J Proteome Res* 3(5): 1009-1016.
- Chen, Y. C., E. B. Taylor, N. Dephoure, J. M. Heo, A. Tonhato, I. Papandreou, N. Nath, N. C. Denko, S. P. Gygi y J. Rutter** (2012). Identification of a protein mediating respiratory supercomplex stability. *Cell Metab* 15(3): 348-360.
- Chen, Z., E. A. Odstrcil, B. P. Tu y S. L. McKnight** (2007). Restriction of DNA replication to the reductive phase of the metabolic cycle protects genome integrity. *Science* 316(5833): 1916-1919.
- Chernyak, B. V., V. N. Dedov y V. L. Gabai** (1994). Mitochondrial ATP hydrolysis and ATP depletion in thymocytes and Ehrlich ascites carcinoma cells. *FEBS Lett* 337(1): 56-59.
- Chernyak, B. V., V. F. Dukhovich y E. Khodjaev** (1991). Regulation of ATP hydrolysis in hepatoma 22a mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 286(2): 604-609.
- Das, A. M.** (2003). Regulation of the mitochondrial ATP-synthase in health and disease. *Mol Genet Metab* 79(2): 71-82.
- Dauer, W. y S. Przedborski** (2003). Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* 39(6): 889-909.
- Daum, B., A. Walter, A. Horst, H. D. Osiewacz y W. Kuhlbrandt** (2013). Age-dependent dissociation of ATP synthase dimers and loss of inner-membrane cristae in mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(38): 15301-15306.
- David, G., J. N. Barrett y E. F. Barrett** (1998). Evidence that mitochondria buffer physiological Ca²⁺ loads in lizard motor nerve terminals. *J Physiol* 509 (Pt 1): 59-65.
- Davies, K. M., C. Anselmi, I. Wittig, J. D. Faraldo-Gomez y W. Kuhlbrandt** (2012a). Structure of the yeast F₁F_o-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(34): 13602-13607.
- Davies, K. M., B. Daum, W. Kuhlbrandt, C. Anselmi y J. Faraldo-Gomez** (2012b). Structure of the mitochondrial ATP synthase and its role in shaping mitochondria cristae. *Microsc Microanal* 18 Suppl 2: 56-57.

- Davies, K. M., M. Strauss, B. Daum, J. H. Kief, H. D. Osiewacz, A. Rycovska, V. Zickermann y W. Kuhlbrandt (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(34): 14121-14126.
- de Chiara, C., G. Nicastro, A. Spisni, F. Zanotti, T. Cocco y S. Papa (2002). Activity and NMR structure of synthetic peptides of the bovine ATPase inhibitor protein, IF1. *Peptides* 23(12): 2127-2141.
- De Gomez-Puyou, M. T., K. Nordenbrand, U. Muller, A. Gomez-Puyou y L. Ernster (1980). The interaction of mitochondrial F1-ATPase with the natural ATPase inhibitor protein. *Biochim Biophys Acta* 592(3): 385-395.
- de Groof, A. J., M. M. te Lindert, M. M. van Dommelen, M. Wu, M. Willemse, A. L. Smift, M. Winer, F. Oerlemans, H. Pluk, J. A. Fransen y B. Wieringa (2009). Increased OXPHOS activity precedes rise in glycolytic rate in H-RasV12/E1A transformed fibroblasts that develop a Warburg phenotype. *Mol Cancer* 8: 54.
- De los Rios Castillo, D., M. Zarco-Zavala, S. Olvera-Sanchez, J. P. Pardo, O. Juarez, F. Martinez, G. Mendoza-Hernandez, J. J. Garcia-Trejo y O. Flores-Herrera (2011). Atypical cristae morphology of human syncytiotrophoblast mitochondria: role for complex V. *J Biol Chem* 286(27): 23911-23919.
- De Meirleir, L., S. Seneca, W. Lissens, I. De Clercq, F. Eyskens, E. Gerlo, J. Smet y R. Van Coster (2004). Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet* 41(2): 120-124.
- De Stefani, D., A. Raffaello, E. Teardo, I. Szabo y R. Rizzuto (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476(7360): 336-340.
- DeBerardinis, R. J., A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrli y C. B. Thompson (2007). Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49): 19345-19350.
- Devenish, R. J., M. Prescott y A. J. Rodgers (2008). The structure and function of mitochondrial F1FO-ATP synthases. *Int Rev Cell Mol Biol* 267: 1-58.
- Devi, L., B. M. Prabhu, D. F. Galati, N. G. Avadhani y H. K. Anandatheerthavarada (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 26(35): 9057-9068.
- Dey, R. y C. T. Moraes (2000). Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 275(10): 7087-7094.

- Di Pancrazio, F., I. Mavelli, M. Isola, G. Losano, P. Pagliaro, D. A. Harris y G. Lippe** (2004). In vitro and in vivo studies of F(0)F(1)ATP synthase regulation by inhibitor protein IF(1) in goat heart. *Biochim Biophys Acta* 1659(1): 52-62.
- Di Pietro, A., F. Penin, J. H. Julliard, C. Godinot y D. C. Gautheron** (1988). IF1 inhibition of mitochondrial F1-ATPase is correlated to entrapment of four adenine- or guanine-nucleotides including at least one triphosphate. *Biochem Biophys Res Commun* 152(3): 1319-1325.
- Dianoux, A. C.** (1986). HPLC purification of the natural ATPase inhibitor from the yeast *Candida utilis*. *Biochem Biophys Res Commun* 134(1): 332-337.
- Dianoux, A. C. y J. Hoppe** (1987). Complete amino-acid sequence of the natural ATPase inhibitor from the mitochondria of the yeast *Candida utilis*. *Eur J Biochem* 163(1): 155-160.
- Diaz, F., C. K. Thomas, S. Garcia, D. Hernandez y C. T. Moraes** (2005). Mice lacking COX10 in skeletal muscle recapitulate the phenotype of progressive mitochondrial myopathies associated with cytochrome c oxidase deficiency. *Hum Mol Genet* 14(18): 2737-2748.
- Dienhart, M., K. Pfeiffer, H. Schagger y R. A. Stuart** (2002). Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J Biol Chem* 277(42): 39289-39295.
- Dienhart, M. K. y R. A. Stuart** (2008). The yeast Aac2 protein exists in physical association with the cytochrome bc1-COX supercomplex and the TIM23 machinery. *Mol Biol Cell* 19(9): 3934-3943.
- DiMauro, S., E. Bonilla, C. P. Lee, D. L. Schotland, A. Scarpa, H. Conn, Jr. y B. Chance** (1976). Luft's disease. Further biochemical and ultrastructural studies of skeletal muscle in the second case. *J Neurol Sci* 27(2): 217-232.
- DiMauro, S. y M. Mancuso** (2007). Mitochondrial diseases: therapeutic approaches. *Biosci Rep* 27(1-3): 125-137.
- DiMauro, S. y E. A. Schon** (2001). Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am J Med Genet* 106(1): 18-26.
- Diwan, B. A., J. M. Ward, L. M. Anderson, A. Hagiwara y J. M. Rice** (1986). Lack of effect of phenobarbital on hepatocellular carcinogenesis initiated by N-nitrosodiethylamine or methylazoxymethanol acetate in male Syrian golden hamsters. *Toxicol Appl Pharmacol* 86(2): 298-307.
- Domenis, R., M. Comelli, E. Bisetto y I. Mavelli** (2011). Mitochondrial bioenergetic profile and responses to metabolic inhibition in human hepatocarcinoma cell lines with distinct differentiation characteristics. *J Bioenerg Biomembr* 43(5): 493-505.
- Dominguez-Ramirez, L., G. Mendoza-Hernandez, A. Carabez-Trejo, A. Gomez-Puyou y M. Tuena de Gomez-Puyou** (2001). Equilibrium between monomeric and dimeric mitochondrial F1-inhibitor protein complexes. *FEBS Lett* 507(2): 191-194.

- Drago, I., P. Pizzo y T. Pozzan** (2011). After half a century mitochondrial calcium in- and efflux machineries reveal themselves. *EMBO J* 30(20): 4119-4125.
- Drinkwater, N. R. y J. J. Ginsler** (1986). Genetic control of hepatocarcinogenesis in C57BL/6J and C3H/HeJ inbred mice. *Carcinogenesis* 7(10): 1701-1707.
- Droge, W.** (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82(1): 47-95.
- Duchen, M. R.** (2004). Roles of mitochondria in health and disease. *Diabetes* 53 Suppl 1: S96-102.
- Dudkina, N. V., M. Kudryashev, H. Stahlberg y E. J. Boekema** (2011). Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(37): 15196-15200.
- Dudkina, N. V., S. Sunderhaus, H. P. Braun y E. J. Boekema** (2006). Characterization of dimeric ATP synthase and cristae membrane ultrastructure from *Saccharomyces* and *Polytomella* mitochondria. *FEBS Lett* 580(14): 3427-3432.
- Ekstrand, M. I., M. Terzioglu, D. Galter, S. Zhu, C. Hofstetter, E. Lindqvist, S. Thams, A. Bergstrand, F. S. Hansson, A. Trifunovic, B. Hoffer, S. Cullheim, A. H. Mohammed, L. Olson y N. G. Larsson** (2007). Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(4): 1325-1330.
- Esposito, L. A., S. Melov, A. Panov, B. A. Cottrell y D. C. Wallace** (1999). Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(9): 4820-4825.
- Eto, K., Y. Tsubamoto, Y. Terauchi, T. Sugiyama, T. Kishimoto, N. Takahashi, N. Yamauchi, N. Kubota, S. Murayama, T. Aizawa, Y. Akanuma, S. Aizawa, H. Kasai, Y. Yazaki y T. Kadowaki** (1999). Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion. *Science* 283(5404): 981-985.
- Faccenda, D., C. H. Tan, A. Seraphim, M. R. Duchen y M. Campanella** (2013). IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ* 20(5): 686-697.
- Fife, R. S. y G. W. Sledge, Jr.** (1995). Effects of doxycycline on in vitro growth, migration, and gelatinase activity of breast carcinoma cells. *J Lab Clin Med* 125(3): 407-411.
- Finkel, T.** (2012). Signal transduction by mitochondrial oxidants. *J Biol Chem* 287(7): 4434-4440.
- Formentini, L., M. P. Pereira, L. Sanchez-Cenizo, F. Santacatterina, J. J. Lucas, C. Navarro, A. Martinez-Serrano y J. M. Cuezva** (2014). In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *EMBO J*.
- Formentini, L., M. Sánchez-Aragó, L. Sánchez-Cenizo y J. M. Cuezva** (2012). The mitochondrial ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) triggers a ROS-mediated retrograde pro-survival and proliferative response. *Mol. Cell* 45: 731-742.

- Forno, L. S., J. W. Langston, L. E. DeLanney, I. Irwin y G. A. Ricaurte (1986). Locus ceruleus lesions and eosinophilic inclusions in MPTP-treated monkeys. *Ann Neurol* 20(4): 449-455.
- Freshney, R. I. (2005). "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique" New York, John Wiley & Sons, Inc.
- Frezza, C., S. Cipolat, O. Martins de Brito, M. Micaroni, G. V. Beznoussenko, T. Rudka, D. Bartoli, R. S. Polishuck, N. N. Danial, B. De Strooper y L. Scorrano (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126(1): 177-189.
- Fujikawa, M., H. Imamura, J. Nakamura y M. Yoshida (2012). Assessing actual contribution of IF1, inhibitor of mitochondrial FoF1, to ATP homeostasis, cell growth, mitochondrial morphology, and cell viability. *J Biol Chem* 287(22): 18781-18787.
- Fukumura, D., L. Xu, Y. Chen, T. Gohongi, B. Seed y R. K. Jain (2001). Hypoxia and acidosis independently up-regulate vascular endothelial growth factor transcription in brain tumors in vivo. *Cancer Res* 61(16): 6020-6024.
- Funes, J. M., M. Quintero, S. Henderson, D. Martinez, U. Qureshi, C. Westwood, M. O. Clements, D. Bourboulia, R. B. Pedley, S. Moncada y C. Boshoff (2007). Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(15): 6223-6228.
- Galante, Y. M., S. Y. Wong y Y. Hatefi (1981). Mitochondrial adenosinetriphosphatase inhibitor protein: reversible interaction with complex V (ATP synthetase complex). *Biochemistry* 20(9): 2671-2678.
- Garcia, J. J., E. Morales-Rios, P. Cortes-Hernandez y J. S. Rodriguez-Zavala (2006). The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *Biochemistry* 45(42): 12695-12703.
- Garesse, R. y C. G. Vallejo (2001). Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes. *Gene* 263(1-2): 1-16.
- Gatenby, R. A. y R. J. Gillies (2004). Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat Rev Cancer* 4(11): 891-899.
- Gatenby, R. A. y T. L. Vincent (2003). An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Res* 63(19): 6212-6220.
- Geromel, V., N. Kadhon, I. Cebalos-Picot, O. Ouari, A. Polidori, A. Munnich, A. Rotig y P. Rustin (2001). Superoxide-induced massive apoptosis in cultured skin fibroblasts harboring the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) mutation in the ATPase-6 gene of the mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet* 10(11): 1221-1228.
- Giacomello, M., I. Drago, P. Pizzo y T. Pozzan (2007). Mitochondrial Ca²⁺ as a key regulator of cell life and death. *Cell Death Differ* 14(7): 1267-1274.

- Gilkerson, R. W., J. M. Selker y R. A. Capaldi** (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* 546(2-3): 355-358.
- Gillies, R. J. y R. A. Gatenby** (2007). Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? *J Bioenerg Biomembr* 39(3): 251-257.
- Giorgio, V., E. Bisetto, R. Franca, D. A. Harris, S. Passamonti y G. Lippe** (2010). The ectopic F(O) F(1) ATP synthase of rat liver is modulated in acute cholestasis by the inhibitor protein IF1. *J Bioenerg Biomembr* 42(2): 117-123.
- Giorgio, V., S. von Stockum, M. Antoniel, A. Fabbro, F. Fogolari, M. Forte, G. D. Glick, V. Petronilli, M. Zoratti, I. Szabo, G. Lippe y P. Bernardi** (2013). Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(15): 5887-5892.
- Glater, E. E., L. J. Megeath, R. S. Stowers y T. L. Schwarz** (2006). Axonal transport of mitochondria requires milton to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 173(4): 545-557.
- Gledhill, J. R., M. G. Montgomery, A. G. Leslie y J. E. Walker** (2007). How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(40): 15671-15676.
- Gledhill, J. R. y J. E. Walker** (2005). Inhibition sites in F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochem J* 386(Pt 3): 591-598.
- Golstein, P. y G. Kroemer** (2007). Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* 32(1): 37-43.
- Gomes, L. C., G. Di Benedetto y L. Scorrano** (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13(5): 589-598.
- Gomez-Puyou, A., M. T. de Gomez-Puyou y L. Ernster** (1979). Inactive to active transitions of the mitochondrial ATPase complex as controlled by the ATPase inhibitor. *Biochim Biophys Acta* 547(2): 252-257.
- Gordon-Smith, D. J., R. J. Carbajo, J. C. Yang, H. Videler, M. J. Runswick, J. E. Walker y D. Neuhaus** (2001). Solution structure of a C-terminal coiled-coil domain from bovine IF(1): the inhibitor protein of F(1) ATPase. *J Mol Biol* 308(2): 325-339.
- Graham, B. H., K. G. Waymire, B. Cottrell, I. A. Trounce, G. R. MacGregor y D. C. Wallace** (1997). A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 16(3): 226-234.
- Green, D. R.** (1998). Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 94(6): 695-698.
- Green, D. R. y G. Kroemer** (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305(5684): 626-629.

- Green, D. R. y J. C. Reed** (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281(5381): 1309-1312.
- Green, D. W. y G. J. Grover** (2000). The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1458(2-3): 343-355.
- Greenamyre, J. T., G. MacKenzie, T. I. Peng y S. E. Stephans** (1999). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochem Soc Symp* 66: 85-97.
- Greenamyre, J. T., T. B. Sherer, R. Betarbet y A. V. Panov** (2001). Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* 52(3-5): 135-141.
- Groen, A. K., R. J. Wanders, H. V. Westerhoff, R. van der Meer y J. M. Tager** (1982). Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biol Chem* 257(6): 2754-2757.
- Grover, G. J., K. S. Atwal, P. G. Sleph, F. L. Wang, H. Monshizadegan, T. Monticello y D. W. Green** (2004). Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1F0-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287(4): H1747-1755.
- Guerrieri, F., R. Scarfo, F. Zanotti, Y. W. Che y S. Papa** (1987). Regulatory role of the ATPase inhibitor protein on proton conduction by mitochondrial H⁺-ATPase complex. *FEBS Lett* 213(1): 67-72.
- Gutmann, I. y A. W. Wahlefeld** (1974). "L-(+)-Lactate determination with Lactate Dehydrogenase and NAD". H. U. Bergmeyer Bergmeyer: Methods of Enzymatic Analysis Series New York, Accademic Press.
- Guzy, R. D., B. Hoyos, E. Robin, H. Chen, L. Liu, K. D. Mansfield, M. C. Simon, U. Hammerling y P. T. Schumacker** (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab* 1(6): 401-408.
- Hackenbrock, C. R.** (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30(2): 269-297.
- Hajnoczky, G., R. Hager y A. P. Thomas** (1999). Mitochondria suppress local feedback activation of inositol 1,4, 5-trisphosphate receptors by Ca²⁺. *J Biol Chem* 274(20): 14157-14162.
- Hamanaka, R. B. y N. S. Chandel** (2010). Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* 35: 505-513.
- Hanahan, D. y R. A. Weinberg** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. y R. A. Weinberg** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144(5): 646-674.
- Harman, D.** (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11(3): 298-300.

- Harris, D. A.** (1997). Functional regions of the H(+)-ATPase inhibitory protein from ox heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1320(1): 8-16.
- Harris, D. A. y A. R. Crofts** (1978). The initial stages of photophosphorylation. Studies using excitation by saturating, short flashes of light. *Biochim Biophys Acta* 502(1): 87-102.
- Harris, D. A. y A. M. Das** (1991). Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem J* 280 (Pt 3): 561-573.
- Harris, D. A., V. von Tscharner y G. K. Radda** (1979). The ATPase inhibitor protein in oxidative phosphorylation. The rate-limiting factor to phosphorylation in submitochondrial particles. *Biochim Biophys Acta* 548(1): 72-84.
- Harris, M. H., M. G. Vander Heiden, S. J. Kron y C. B. Thompson** (2000). Role of oxidative phosphorylation in Bax toxicity. *Mol Cell Biol* 20(10): 3590-3596.
- Hartzog, P. E. y B. D. Cain** (1993). The aleu207-->arg mutation in F1F0-ATP synthase from Escherichia coli. A model for human mitochondrial disease. *J Biol Chem* 268(17): 12250-12252.
- Hashimoto, T., Y. Negawa y K. Tagawa** (1981). Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase--stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme. *J Biochem* 90(4): 1151-1157.
- Hashimoto, T., Y. Yamamoto, Y. Yoshida y K. Tagawa** (1995). Cleavage of bovine mitochondrial ATPase inhibitor with endopeptidases, and binding of the resulting peptides to the interface between the alpha- and beta-subunits of F1ATPase. *J Biochem* 117(3): 641-647.
- Hashimoto, T., Y. Yoshida y K. Tagawa** (1984). Purification and properties of factors in yeast mitochondria stabilizing the F1F0-ATPase-inhibitor complex. *J Biochem* 95(1): 131-136.
- Hashimoto, T., Y. Yoshida y K. Tagawa** (1990). Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. *J Biochem* 108(1): 17-20.
- Hatefi, Y.** (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu Rev Biochem* 54: 1015-1069.
- Hatzivassiliou, G., F. Zhao, D. E. Bauer, C. Andreadis, A. N. Shaw, D. Dhanak, S. R. Hingorani, D. A. Tuveson y C. B. Thompson** (2005). ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. *Cancer Cell* 8(4): 311-321.
- Hayashi, T., R. Rizzuto, G. Hajnoczky y T. P. Su** (2009). MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19(2): 81-88.
- Haydar, N. A., H. L. Conn, Jr., A. Afifi, N. Wakid, S. Ballas y K. Fawaz** (1971). Severe hypermetabolism with primary abnormality of skeletal muscle mitochondria. *Ann Intern Med* 74(4): 548-558.
- He, Q. Y., J. Chen, H. F. Kung, A. P. Yuen y J. F. Chiu** (2004). Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics* 4(1): 271-278.

- Heindryckx, F., I. Colle y H. Van Vlierberghe (2009). Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research. *Int J Exp Pathol* 90(4): 367-386.
- Hekimi, S., J. Lapointe y Y. Wen (2011). Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol* 21(10): 569-576.
- Hekman, C., J. M. Tomich y Y. Hatefi (1991). Mitochondrial ATP synthase complex. Membrane topography and stoichiometry of the F₀ subunits. *J Biol Chem* 266(21): 13564-13571.
- Hernlund, E., E. Hjerpe, E. Avall-Lundqvist y M. Shoshan (2009). Ovarian carcinoma cells with low levels of beta-F1-ATPase are sensitive to combined platinum and 2-deoxy-D-glucose treatment. *Mol Cancer Ther* 8(7): 1916-1923.
- Herranz, D., M. Munoz-Martin, M. Canamero, F. Mulero, B. Martinez-Pastor, O. Fernandez-Capetillo y M. Serrano (2010). Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Commun* 1: 3.
- Herrmann, J. M. (2011). MINOS is plus: a Mitofilin complex for mitochondrial membrane contacts. *Dev Cell* 21(4): 599-600.
- Hirschey, M. D., T. Shimazu, E. Goetzman, E. Jing, B. Schwer, D. B. Lombard, C. A. Grueter, C. Harris, S. Biddinger, O. R. Ilkayeva, R. D. Stevens, Y. Li, A. K. Saha, N. B. Ruderman, J. R. Bain, C. B. Newgard, R. V. Farese, Jr., F. W. Alt, C. R. Kahn y E. Verdin (2010). SIRT3 regulates mitochondrial fatty-acid oxidation by reversible enzyme deacetylation. *Nature* 464(7285): 121-125.
- Hjerpe, E., S. Egyhazi Brage, J. Carlson, M. Frostvik Stolt, K. Schedvins, H. Johansson, M. Shoshan y E. Avall-Lundqvist (2013). Metabolic markers GAPDH, PKM2, ATP5B and BEC-index in advanced serous ovarian cancer. *BMC Clin Pathol* 13(1): 30.
- Hollenbeck, P. J. y W. M. Saxton (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118(Pt 23): 5411-5419.
- Horstman, L. L. y E. Racker (1970). Partial resolution of the enzyme catalyzing oxidative phosphorylation. XXII. Interaction between mitochondrial adenosine triphosphatase inhibitor and mitochondrial adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* 245(6): 1336-1344.
- Houstek, J., P. Klement, D. Floryk, H. Antonicka, J. Hermanska, M. Kalous, H. Hansikova, H. Hout'kova, S. K. Chowdhury, T. Rosipal, S. Kmoch, L. Stratilova y J. Zeman (1999). A novel deficiency of mitochondrial ATPase of nuclear origin. *Hum Mol Genet* 8(11): 1967-1974.
- Houstek, J., P. Klement, J. Hermanska, H. Houstkova, H. Hansikova, C. Van den Bogert y J. Zeman (1995). Altered properties of mitochondrial ATP-synthase in patients with a T-->G mutation in the ATPase 6 (subunit a) gene at position 8993 of mtDNA. *Biochim Biophys Acta* 1271(2-3): 349-357.
- Houstek, J., A. Pickova, A. Vojtiskova, T. Mracek, P. Pecina y P. Jesina (2006). Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1400-1405.

- Houtkooper, R. H., E. Pirinen y J. Auwerx (2012). Sirtuins as regulators of metabolism and health-span. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(4): 225-238.
- Hsieh, Y. C., C. Hsu, R. C. Yang, P. Y. Lee, H. K. Hsu y Y. M. Sun (2004). Isolation of bona fide differentially expressed genes in the 18-hour sepsis liver by suppression subtractive hybridization. *Shock* 21(6): 549-555.
- Hu, X., D. M. Macdonald, P. C. Huettnner, Z. Feng, I. M. El Naqa, J. K. Schwarz, D. G. Mutch, P. W. Grigsby, S. N. Powell y X. Wang (2009). A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 114(3): 457-464.
- Huang, L. J., I. C. Chuang, H. P. Dong y R. C. Yang (2011). Hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the expression of the mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in rat liver. *Shock* 36(1): 90-96.
- Huang, L. J., C. Hsu, T. N. Tsai, S. J. Wang y R. C. Yang (2007). Suppression of mitochondrial ATPase inhibitor protein (IF1) in the liver of late septic rats. *Biochim Biophys Acta* 1767(7): 888-896.
- Hume, D. A., J. L. Radik, E. Ferber y M. J. Weidemann (1978). Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation. *Biochem J* 174(3): 703-709.
- Husain, I. y D. A. Harris (1983). ATP synthesis and hydrolysis in submitochondrial particles subjected to an acid-base transition. Effects of the ATPase inhibitor protein. *FEBS Lett* 160(1-2): 110-114.
- Ichikawa, N., C. Ando y M. Fumino (2006). Caenorhabditis elegans MAI-1 protein, which is similar to mitochondrial ATPase inhibitor (IF1), can inhibit yeast FOF1-ATPase but cannot be transported to yeast mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 38(2): 93-99.
- Ichikawa, N., K. Nakabayashi y T. Hashimoto (2002). A yeast mitochondrial ATPase inhibitor interacts with three proteins that are easy to dissociate from the mitochondrial inner membrane. *J Biochem* 132(4): 649-654.
- Ishikawa, K., K. Takenaga, M. Akimoto, N. Koshikawa, A. Yamaguchi, H. Imanishi, K. Nakada, Y. Honma y J. Hayashi (2008). ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 320(5876): 661-664.
- Isidoro, A., E. Casado, A. Redondo, P. Acebo, E. Espinosa, A. M. Alonso, P. Cejas, D. Hardisson, J. A. Fresno Vara, C. Belda-Iniesta, M. Gonzalez-Baron y J. M. Cuezva (2005). Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis* 26(12): 2095-2104.
- Isidoro, A., M. Martinez, P. L. Fernandez, A. D. Ortega, G. Santamaria, M. Chamorro, J. C. Reed y J. M. Cuezva (2004). Alteration of the bioenergetic phenotype of mitochondria is a hallmark of breast, gastric, lung and oesophageal cancer. *Biochem J* 378(Pt 1): 17-20.

- Ito, K., A. Hirao, F. Arai, S. Matsuoka, K. Takubo, I. Hamaguchi, K. Nomiyama, K. Hosokawa, K. Sakurada, N. Nakagata, Y. Ikeda, T. W. Mak y T. Suda (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431(7011): 997-1002.
- Itoh, H., A. Takahashi, K. Adachi, H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida y K. Kinoshita (2004). Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature* 427(6973): 465-468.
- Izquierdo, J. M. y J. M. Cuezva (1993). Evidence of post-transcriptional regulation in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 196(1): 55-60.
- Izquierdo, J. M., J. Ricart, L. K. Ostronoff, G. Egea y J. M. Cuezva (1995). Changing patterns of transcriptional and post-transcriptional control of beta-F1-ATPase gene expression during mitochondrial biogenesis in liver. *J Biol Chem* 270(17): 10342-10350.
- Jaattela, M. (2004). Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene* 23(16): 2746-2756.
- Jaworek, D., W. Gruber y H. U. Bergmeyer (1974). "Adenosine-5'-diphosphate and Adenosine-5'-monophosphate". H. U. Bergmeyer Bergmeyer: Methods of Enzymatic Analysis Series New York, Academic Press.
- Jennings, R. B. y K. A. Reimer (1991a). The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 42: 225-246.
- Jennings, R. B., K. A. Reimer y C. Steenbergen (1991b). Effect of inhibition of the mitochondrial ATPase on net myocardial ATP in total ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 23(12): 1383-1395.
- Jitrapakdee, S., A. Wutthisathapornchai, J. C. Wallace y M. J. MacDonald (2010). Regulation of insulin secretion: role of mitochondrial signalling. *Diabetologia* 53(6): 1019-1032.
- Johnson, M. T., S. Mahmood y M. S. Patel (2003). Intermediary metabolism and energetics during murine early embryogenesis. *J Biol Chem* 278(34): 31457-31460.
- Jonckheere, A. I., M. Hogeveen, L. G. Nijtmans, M. A. van den Brand, A. J. Janssen, J. H. Diepstra, F. C. van den Brandt, L. P. van den Heuvel, F. A. Hol, T. G. Hofste, L. Kapusta, U. Dillmann, M. G. Shamdeen, J. A. Smeitink y R. J. Rodenburg (2008). A novel mitochondrial ATP8 gene mutation in a patient with apical hypertrophic cardiomyopathy and neuropathy. *J Med Genet* 45(3): 129-133.
- Jouaville, L. S., F. Ichas, E. L. Holmuhamedov, P. Camacho y J. D. Lechleiter (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377(6548): 438-441.
- Jouaville, L. S., P. Pinton, C. Bastianutto, G. A. Rutter y R. Rizzuto (1999). Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(24): 13807-13812.

- Joza, N., G. Y. Oudit, D. Brown, P. Benit, Z. Kassiri, N. Vahsen, L. Benoit, M. M. Patel, K. Nowikovsky, A. Vassault, P. H. Backx, T. Wada, G. Kroemer, P. Rustin y J. M. Penninger** (2005). Muscle-specific loss of apoptosis-inducing factor leads to mitochondrial dysfunction, skeletal muscle atrophy, and dilated cardiomyopathy. *Mol Cell Biol* 25(23): 10261-10272.
- Keunen, O., M. Johansson, A. Oudin, M. Sanzey, S. A. Rahim, F. Fack, F. Thorsen, T. Taxt, M. Bartos, R. Jirik, H. Miletic, J. Wang, D. Stieber, L. Stuhr, I. Moen, C. B. Rygh, R. Bjerkvig y S. P. Niclou** (2011). Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(9): 3749-3754.
- Khodjaev, E., F. B. Komarnitsky, G. Capozza, V. F. Dukhovich, B. V. Chernyak y S. Papa** (1990). Activation of a complex of ATPase with the natural protein inhibitor in submitochondrial particles. *FEBS Lett* 272(1-2): 145-148.
- Kibbe, W. A.** (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue): W43-46.
- Kim, J. Y., Y. H. Kim, I. Chang, S. Kim, Y. K. Pak, B. H. Oh, H. Yagita, Y. K. Jung, Y. J. Oh y M. S. Lee** (2002). Resistance of mitochondrial DNA-deficient cells to TRAIL: role of Bax in TRAIL-induced apoptosis. *Oncogene* 21(20): 3139-3148.
- Kim, S. H., R. Vlkolinsky, N. Cairns y G. Lubec** (2000). Decreased levels of complex III core protein 1 and complex V beta chain in brains from patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 57(12): 1810-1816.
- Kistner, A., M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jerecic, C. Ullmer, H. Lubbert y H. Bujard** (1996). Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(20): 10933-10938.
- Klein, G., M. Satre, A. C. Dianoux y P. V. Vignais** (1980). Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (14C)isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry* 19(13): 2919-2925.
- Klein, G., M. Satre, A. C. Dianoux y P. V. Vignais** (1981). Photoaffinity labeling of mitochondrial adenosine triphosphatase by an azido derivative of the natural adenosine triphosphate inhibitor. *Biochemistry* 20(5): 1339-1344.
- Klein, J. A., C. M. Longo-Guess, M. P. Rossmann, K. L. Seburn, R. E. Hurd, W. N. Frankel, R. T. Bronson y S. L. Ackerman** (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419(6905): 367-374.
- Kondoh, H., M. E. Leonart, Y. Nakashima, M. Yokode, M. Tanaka, D. Bernard, J. Gil y D. Beach** (2007). A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal* 9(3): 293-299.

- Korshunov, S. S., V. P. Skulachev y A. A. Starkov (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416(1): 15-18.
- Kraft, C. S., C. M. LeMoine, C. N. Lyons, D. Michaud, C. R. Mueller y C. D. Moyes (2006). Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 290(4): C1119-1127.
- Kroemer, G., B. Dallaporta y M. Resche Rigon (1998). The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 619-642.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E. S. Alnemri, E. H. Baehrecke, M. V. Blagosklonny, W. S. El-Deiry, P. Golstein, D. R. Green, M. Hengartner, R. A. Knight, S. Kumar, S. A. Lipton, W. Malorni, G. Nunez, M. E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky y G. Melino (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ* 16(1): 3-11.
- Kruse, S. E., W. C. Watt, D. J. Marcinek, R. P. Kapur, K. A. Schenkman y R. D. Palmiter (2008). Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab* 7(4): 312-320.
- Kucharczyk, R., M. Zick, M. Bietenhader, M. Rak, E. Couplan, M. Blondel, S. D. Caubet y J. P. di Rago (2009). Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches. *Biochim Biophys Acta* 1793(1): 186-199.
- Lane, N. y W. Martin (2010). The energetics of genome complexity. *Nature* 467(7318): 929-934.
- Lapointe, J. y S. Hekimi (2010). When a theory of aging ages badly. *Cell Mol Life Sci* 67(1): 1-8.
- Lapiente-Brun, E., R. Moreno-Loshuertos, R. Acin-Perez, A. Latorre-Pellicer, C. Colas, E. Balsa, E. Perales-Clemente, P. M. Quiros, E. Calvo, M. A. Rodriguez-Hernandez, P. Navas, R. Cruz, A. Carracedo, C. Lopez-Otin, A. Perez-Martos, P. Fernandez-Silva, E. Fernandez-Vizarra y J. A. Enriquez (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340(6140): 1567-1570.
- Larsson, N. G., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Oldfors, P. Rustin, M. Lewandoski, G. S. Barsh y D. A. Clayton (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18(3): 231-236.
- Lasagna-Reeves, C. A., D. L. Castillo-Carranza, U. Sengupta, A. L. Clos, G. R. Jackson y R. Kaye (2011). Tau oligomers impair memory and induce synaptic and mitochondrial dysfunction in wild-type mice. *Mol Neurodegener* 6: 39.
- Lebowitz, M. S. y P. L. Pedersen (1993). Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex: cDNA cloning, sequence, overexpression, and secondary structural characterization of a functional protein inhibitor. *Arch Biochem Biophys* 301(1): 64-70.
- Lebowitz, M. S. y P. L. Pedersen (1996). Protein inhibitor of mitochondrial ATP synthase: relationship of inhibitor structure to pH-dependent regulation. *Arch Biochem Biophys* 330(2): 342-354.

- Lee, I., A. R. Salomon, S. Ficarro, I. Mathes, F. Lottspeich, L. I. Grossman y M. Huttemann** (2005). cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J Biol Chem* 280(7): 6094-6100.
- Lefebvre, V., Q. Du, S. Baird, A. C. Ng, M. Nascimento, M. Campanella, H. M. McBride y R. A. Screaton** (2013). Genome-wide RNAi screen identifies ATPase inhibitory factor 1 (ATPIF1) as essential for PARK2 recruitment and mitophagy. *Autophagy* 9(11).
- Lenaz, G. y M. L. Genova** (2007). Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 292(4): C1221-1239.
- Leveen, P., H. Kotarsky, M. Morgelin, R. Karikoski, E. Elmer y V. Fellman** (2011). The GRACILE mutation introduced into Bcs1l causes postnatal complex III deficiency: a viable mouse model for mitochondrial hepatopathy. *Hepatology* 53(2): 437-447.
- Levine, B. y G. Kroemer** (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132(1): 27-42.
- Li, H., J. Wang, H. Wilhelmsson, A. Hansson, P. Thoren, J. Duffy, P. Rustin y N. G. Larsson** (2000). Genetic modification of survival in tissue-specific knockout mice with mitochondrial cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3467-3472.
- Li, R. J., G. S. Zhang, Y. H. Chen, J. F. Zhu, Q. J. Lu, F. J. Gong y W. Y. Kuang** (2010a). Down-regulation of mitochondrial ATPase by hypermethylation mechanism in chronic myeloid leukemia is associated with multidrug resistance. *Ann Oncol* 7: 1506-1514.
- Li, Y., Q. Liang, Y. Q. Wen, L. L. Chen, L. T. Wang, Y. L. Liu, C. Q. Luo, H. Z. Liang, M. T. Li y Z. Li** (2010b). Comparative proteomics analysis of human osteosarcomas and benign tumor of bone. *Cancer Genet Cytogenet* 198(2): 97-106.
- Liesa, M. y O. S. Shirihai** (2013). Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab* 17(4): 491-506.
- Lill, R., B. Hoffmann, S. Molik, A. J. Pierik, N. Rietzschel, O. Stehling, M. A. Uzarska, H. Weber, C. Wilbrecht y U. Muhlenhoff** (2012). The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1823(9): 1491-1508.
- Lim, D., L. Fedrizzi, M. Tartari, C. Zuccato, E. Cattaneo, M. Brini y E. Carafoli** (2008). Calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in striatal neurons of Huntington disease. *J Biol Chem* 283(9): 5780-5789.
- Lin, P. C., J. K. Lin, S. H. Yang, H. S. Wang, A. F. Li y S. C. Chang** (2008). Expression of beta-F1-ATPase and mitochondrial transcription factor A and the change in mitochondrial DNA content in colorectal cancer: clinical data analysis and evidence from an in vitro study. *Int J Colorectal Dis* 23(12): 1223-1232.
- Lippe, G., M. C. Sorgato y D. A. Harris** (1988). Kinetics of the release of the mitochondrial inhibitor protein. Correlation with synthesis and hydrolysis of ATP. *Biochim Biophys Acta* 933(1): 1-11.

- Lopez-Mediavilla, C., H. Vigny y C. Godinot** (1993). Docking the mitochondrial inhibitor protein IF1 to a membrane receptor different from the F1-ATPase beta subunit. *Eur J Biochem* 215(2): 487-496.
- Lopez-Rios, F., M. Sanchez-Arago, E. Garcia-Garcia, A. D. Ortega, J. R. Berrendero, F. Pozo-Rodriguez, A. Lopez-Encuentra, C. Ballestin y J. M. Cuezva** (2007). Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res* 67(19): 9013-9017.
- Luciakova, K. y S. Kuzela** (1984). Increased content of natural ATPase inhibitor in tumor mitochondria. *FEBS Lett* 177(1): 85-88.
- Luft, R.** (1992). Luft's disease revisited. Severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control. *Mt Sinai J Med* 59(2): 140-145.
- Luft, R., D. Ikkos, G. Palmieri, L. Ernster y B. Afzelius** (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41: 1776-1804.
- Maassen, J. A., L. M. t Hart, G. M. Janssen, E. Reiling, J. A. Romijn y H. H. Lemkes** (2006). Mitochondrial diabetes and its lessons for common Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 5): 819-823.
- Maechler, P., E. D. Kennedy, T. Pozzan y C. B. Wollheim** (1997). Mitochondrial activation directly triggers the exocytosis of insulin in permeabilized pancreatic beta-cells. *EMBO J* 16(13): 3833-3841.
- Mannella, C. A.** (2000). Introduction: our changing views of mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 32(1): 1-4.
- Mannella, C. A.** (2006). The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta* 1762(2): 140-147.
- Mao, H. Z. y J. Weber** (2007). Identification of the betaTP site in the x-ray structure of F1-ATPase as the high-affinity catalytic site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47): 18478-18483.
- Marchini, S., D. Cavalieri, R. Fruscio, E. Calura, D. Garavaglia, I. F. Nerini, C. Mangioni, G. Catto-retti, L. Clivio, L. Beltrame, D. Katsaros, L. Scarampi, G. Menato, P. Perego, G. Chiorino, A. Buda, C. Romualdi y M. D'Incalci** (2011). Association between miR-200c and the survival of patients with stage I epithelial ovarian cancer: a retrospective study of two independent tumour tissue collections. *Lancet Oncol* 12(3): 273-285.
- Martinez-Diez, M., G. Santamaria, A. D. Ortega y J. M. Cuezva** (2006). Biogenesis and Dynamics of Mitochondria during the Cell Cycle: Significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* 1: e107.
- Martinez-Reyes, I., M. Sanchez-Arago y J. M. Cuezva** (2012). AMPK and GCN2-ATF4 signal the repression of mitochondria in colon cancer cells. *Biochem J* 444(2): 249-259.

- Martinez, L. O., S. Jacquet, J. P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezon, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J. E. Walker, F. Terce, X. Collet, B. Perret y R. Barbaras** (2003). Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature* 421.(6918.): 75-79.
- Martinou, J. C. y R. J. Youle** (2011). Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. *Dev Cell* 21(1): 92-101.
- Mateescu, B., L. Batista, M. Cardon, T. Gruosso, Y. de Feraudy, O. Mariani, A. Nicolas, J. P. Meyn-iel, P. Cottu, X. Sastre-Garau y F. Mechta-Grigoriou** (2011). miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat Med* 17(12): 1627-1635.
- Mathew, R., C. M. Karp, B. Beaudoin, N. Vuong, G. Chen, H. Y. Chen, K. Bray, A. Reddy, G. Bhanot, C. Gelinas, R. S. Dipaola, V. Karantza-Wadsworth y E. White** (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137(6): 1062-1075.
- Matsuda, N., S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C. A. Gautier, Y. S. Sou, S. Saiki, S. Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori y K. Tanaka** (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J Cell Biol* 189(2): 211-221.
- Matsuyama, S., Q. Xu, J. Velours y J. C. Reed** (1998). The Mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* 1(3): 327-336.
- Mattson, M. P., M. Gleichmann y A. Cheng** (2008). Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60(5): 748-766.
- Mayford, M., M. E. Bach, Y. Y. Huang, L. Wang, R. D. Hawkins y E. R. Kandel** (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* 274(5293): 1678-1683.
- Mayr, J. A., V. Havlickova, F. Zimmermann, I. Magler, V. Kaplanova, P. Jesina, A. Pecinova, H. Nuskova, J. Koch, W. Sperl y J. Houstek** (2010). Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Hum Mol Genet* 19(17): 3430-3439.
- McCormack, J. G., A. P. Halestrap y R. M. Denton** (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70(2): 391-425.
- Milgrom, Y. M.** (1991). When beef-heart mitochondrial F₁-ATPase is inhibited by inhibitor protein a nucleotide is trapped in one of the catalytic sites. *Eur J Biochem* 200(3): 789-795.
- Milstein, C.** (1999). The hybridoma revolution: an offshoot of basic research. *Bioessays* 21(11): 966-973.

- Millington, D. S. y R. D. Stevens** (2011). Acylcarnitines: analysis in plasma and whole blood using tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol* 708: 55-72.
- Minauro-Sanmiguel, F., C. Bravo y J. J. Garcia** (2002). Cross-linking of the endogenous inhibitor protein (IF1) with rotor (gamma, epsilon) and stator (alpha) subunits of the mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 34(6): 433-443.
- Minauro-Sanmiguel, F., S. Wilkens y J. J. Garcia** (2005). Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(35): 12356-12358.
- Mitchell, P.** (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144-148.
- Mitchell, P. y J. Moyle** (1967). Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213(5072): 137-139.
- Mittal, C. K. y F. Murad** (1977). Activation of guanylate cyclase by superoxide dismutase and hydroxyl radical: a physiological regulator of guanosine 3',5'-monophosphate formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(10): 4360-4364.
- Mogensen, M., K. Sahlin, M. Fernstrom, D. Glintborg, B. F. Vind, H. Beck-Nielsen y K. Hojlund** (2007). Mitochondrial respiration is decreased in skeletal muscle of patients with type 2 diabetes. *Diabetes* 56(6): 1592-1599.
- Mootha, V. K., J. Bunkenborg, J. V. Olsen, M. Hjerrild, J. R. Wisniewski, E. Stahl, M. S. Bolouri, H. N. Ray, S. Sihag, M. Kamal, N. Patterson, E. S. Lander y M. Mann** (2003a). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* 115(5): 629-640.
- Mootha, V. K., C. M. Lindgren, K. F. Eriksson, A. Subramanian, S. Sihag, J. Lehar, P. Puigserver, E. Carlsson, M. Ridderstrale, E. Laurila, N. Houstis, M. J. Daly, N. Patterson, J. P. Mesirov, T. R. Golub, P. Tamayo, B. Spiegelman, E. S. Lander, J. N. Hirschhorn, D. Altshuler y L. C. Groop** (2003b). PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34(3): 267-273.
- Moreno-Lastres, D., F. Fontanesi, I. Garcia-Consuegra, M. A. Martin, J. Arenas, A. Barrientos y C. Ugalde** (2012). Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell Metab* 15(3): 324-335.
- Murphy, M. P.** (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417(1): 1-13.
- Murphy, M. P., A. Holmgren, N. G. Larsson, B. Halliwell, C. J. Chang, B. Kalyanaraman, S. G. Rhee, P. J. Thornalley, L. Partridge, D. Gems, T. Nystrom, V. Belousov, P. T. Schumacker y C. C. Winterbourn** (2011). Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab* 13(4): 361-366.
- Nelson, D. L. y M. M. Cox** (2004). "Lehninger Principles of Biochemistry (4th edition). ", W H Freeman & Co.

- Nelson, D. L. y M. M. Cox (2007). Lehninger, Principles of Biochemistry, 4th edition.
- Nelson, P. N., G. M. Reynolds, E. E. Waldron, E. Ward, K. Giannopoulos y P. G. Murray (2000). Monoclonal antibodies. *Mol Pathol* 53(3): 111-117.
- Nemoto, S., K. Takeda, Z. X. Yu, V. J. Ferrans y T. Finkel (2000). Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol* 20(19): 7311-7318.
- Norling, B., C. Tourikas, B. Hamasur y E. Glaser (1990). Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. Purification and characterization. *Eur J Biochem* 188(2): 247-252.
- Orrenius, S., V. Gogvadze y B. Zhivotovsky (2007). Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47: 143-183.
- Ortega, A. D., S. Sala, E. Espinosa, M. Gonzalez-Baron y J. M. Cuezva (2008). HuR and the bioenergetic signature of breast cancer: a low tumor expression of the RNA-binding protein predicts a higher risk of disease recurrence. *Carcinogenesis* 29(11): 2053-2061.
- Ortega, A. D., M. Sanchez-Arago, D. Giner-Sanchez, L. Sanchez-Cenizo, I. Willers y J. M. Cuezva (2009). Glucose avidity of carcinomas. *Cancer Lett* 276(2): 125-135.
- Ortega, A. D., I. M. Willers, S. Sala y J. M. Cuezva (2010). Human G3BP1 interacts with beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *J Cell Sci* 123(Pt 16): 2685-2696.
- Osman, C., D. R. Voelker y T. Langer (2011). Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol* 192(1): 7-16.
- Pagliarini, D. J., S. E. Calvo, B. Chang, S. A. Sheth, S. B. Vafai, S. E. Ong, G. A. Walford, C. Sugiana, A. Boneh, W. K. Chen, D. E. Hill, M. Vidal, J. G. Evans, D. R. Thorburn, S. A. Carr y V. K. Mootha (2008). A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 134(1): 112-123.
- Pagnozzi, D., L. Birolo, G. Leo, S. Contessi, G. Lippe, P. Pucci y I. Mavelli (2010). Stoichiometry and topology of the complex of the endogenous ATP synthase inhibitor protein IF(1) with calmodulin. *Biochemistry* 49(35): 7542-7552.
- Panchenko, M. V. y A. D. Vinogradov (1985). Interaction between the mitochondrial ATP synthetase and ATPase inhibitor protein. Active/inactive slow pH-dependent transitions of the inhibitor protein. *FEBS Lett* 184(2): 226-230.
- Pandey, M., K. P. Mohanakumar y R. Usha (2010). Mitochondrial functional alterations in relation to pathophysiology of Huntington's disease. *J Bioenerg Biomembr* 42(3): 217-226.
- Pansini, A., F. Guerrieri y S. Papa (1978). Control of proton conduction by the H⁺-ATPase in the inner mitochondrial membrane. *Eur J Biochem* 92(2): 545-551.
- Papa, S., F. Zanotti, T. Cocco, C. Perrucci, C. Candita y M. Minuto (1996). Identification of functional domains and critical residues in the adenosinetriphosphatase inhibitor protein of mitochondrial FOF1 ATP synthase. *Eur J Biochem* 240(2): 461-467.

- Papa, S., F. Zanotti y A. Gaballo** (2000). The structural and functional connection between the catalytic and proton translocating sectors of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 32(4): 401-411.
- Park, S. Y., I. Chang, J. Y. Kim, S. W. Kang, S. H. Park, K. Singh y M. S. Lee** (2004). Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* 279(9): 7512-7520.
- Parker, W. D., Jr., C. M. Filley y J. K. Parks** (1990). Cytochrome oxidase deficiency in Alzheimer's disease. *Neurology* 40(8): 1302-1303.
- Parlo, R. A. y P. S. Coleman** (1984). Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol. *J Biol Chem* 259(16): 9997-10003.
- Parsons, D. W., S. Jones, X. Zhang, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, H. Carter, I. M. Siu, G. L. Gallia, A. Olivi, R. McLendon, B. A. Rasheed, S. Keir, T. Nikolskaya, Y. Nikolsky, D. A. Busam, H. Tekleab, L. A. Diaz, Jr., J. Hartigan, D. R. Smith, R. L. Strausberg, S. K. Marie, S. M. Shinjo, H. Yan, G. J. Riggins, D. D. Bigner, R. Karchin, N. Papadopoulos, G. Parmigiani, B. Vogelstein, V. E. Velculescu y K. W. Kinzler** (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321(5897): 1807-1812.
- Patsi, J., M. Kervinen, M. Finel y I. E. Hassinen** (2008). Leber hereditary optic neuropathy mutations in the ND6 subunit of mitochondrial complex I affect ubiquinone reduction kinetics in a bacterial model of the enzyme. *Biochem J* 409(1): 129-137.
- Patti, M. E., A. J. Butte, S. Crunkhorn, K. Cusi, R. Berria, S. Kashyap, Y. Miyazaki, I. Kohane, M. Costello, R. Saccone, E. J. Landaker, A. B. Goldfine, E. Mun, R. DeFronzo, J. Finlayson, C. R. Kahn y L. J. Mandarino** (2003). Coordinated reduction of genes of oxidative metabolism in humans with insulin resistance and diabetes: Potential role of PGC1 and NRF1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8466-8471.
- Patti, M. E. y S. Corvera** (2010). The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 31(3): 364-395.
- Paumard, P., J. Vaillier, B. Coulary, J. Schaeffer, V. Soubannier, D. M. Mueller, D. Brethes, J. P. di Rago y J. Velours** (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21(3): 221-230.
- Pedersen, P. L. y J. Hullihen** (1984). Inhibitor peptide of mitochondrial proton adenosine triphosphatase. Neutralization of its inhibitory action by calmodulin. *J Biol Chem* 259(24): 15148-15153.
- Penin, F., A. Di Pietro, C. Godinot y D. C. Gautheron** (1988). Fate of nucleotides bound to reconstituted Fo-F1 during adenosine 5'-triphosphate synthesis activation or hydrolysis: role of protein inhibitor and hysteretic inhibition. *Biochemistry* 27(25): 8969-8974.

- Perkins, G. A. y T. G. Frey** (2000). Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Micron* 31(1): 97-111.
- Petros, J. A., A. K. Baumann, E. Ruiz-Pesini, M. B. Amin, C. Q. Sun, J. Hall, S. Lim, M. M. Issa, W. D. Flanders, S. H. Hosseini, F. F. Marshall y D. C. Wallace** (2005). mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(3): 719-724.
- Pfeiffer, K., V. Gohil, R. A. Stuart, C. Hunte, U. Brandt, M. L. Greenberg y H. Schagger** (2003). Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 278(52): 52873-52880.
- Pickrell, A. M., M. Pinto, A. Hida y C. T. Moraes** (2011). Striatal dysfunctions associated with mitochondrial DNA damage in dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 31(48): 17649-17658.
- Pitceathly, R. D., S. M. Murphy, E. Cottenie, A. Chalasani, M. G. Sweeney, C. Woodward, E. E. Mudanohwo, I. Hargreaves, S. Heales, J. Land, J. L. Holton, H. Houlden, J. Blake, M. Champion, F. Flinter, S. A. Robb, R. Page, M. Rose, J. Palace, C. Crowe, C. Longman, M. P. Lunn, S. Rahman, M. M. Reilly y M. G. Hanna** (2012). Genetic dysfunction of MT-ATP6 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurology* 79(11): 1145-1154.
- Plas, D. R. y C. B. Thompson** (2002). Cell metabolism in the regulation of programmed cell death. *Trends Endocrinol Metab* 13(2): 75-78.
- Plathow, C. y W. A. Weber** (2008). Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med* 49 Suppl 2: 43S-63S.
- Polgreen, K. E., J. Featherstone, A. C. Willis y D. A. Harris** (1995). Primary structure and properties of the inhibitory protein of the mitochondrial ATPase (H(+)-ATP synthase) from potato. *Biochim Biophys Acta* 1229(2): 175-180.
- Power, J., R. L. Cross y D. A. Harris** (1983). Interaction of F1-ATPase, from ox heart mitochondria with its naturally occurring inhibitor protein. Studies using radio-iodinated inhibitor protein. *Biochim Biophys Acta* 724(1): 128-141.
- Prabu, S. K., H. K. Anandatheerthavarada, H. Raza, S. Srinivasan, J. F. Spear y N. G. Avadhani** (2006). Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem* 281(4): 2061-2070.
- Pullman, M. E. y G. C. Monroy** (1963). A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *J Biol Chem* 238: 3762-3769.
- Quintana, A., S. E. Kruse, R. P. Kapur, E. Sanz y R. D. Palmiter** (2010). Complex I deficiency due to loss of Ndufs4 in the brain results in progressive encephalopathy resembling Leigh syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(24): 10996-11001.
- Raffaello, A., D. De Stefani y R. Rizzuto** (2012). The mitochondrial Ca(2+) uniporter. *Cell Calcium* 52(1): 16-21.

- Rak, M., E. Tetaud, S. Duvezin-Caubet, N. Ezkurdia, M. Bietenhader, J. Rytka y J. P. di Rago** (2007). A yeast model of the neurogenic ataxia retinitis pigmentosa (NARP) T8993G mutation in the mitochondrial ATP synthase-6 gene. *J Biol Chem* **282**(47): 34039-34047.
- Ramanathan, A., C. Wang y S. L. Schreiber** (2005). Perturbational profiling of a cell-line model of tumorigenesis by using metabolic measurements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(17): 5992-5997.
- Rambold, A. S., B. Kostelecky, N. Elia y J. Lippincott-Schwartz** (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(25): 10190-10195.
- Ramzan, R., K. Staniek, B. Kadenbach y S. Vogt** (2010). Mitochondrial respiration and membrane potential are regulated by the allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1797**(9): 1672-1680.
- Rasola, A. y P. Bernardi** (2011). Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* **50**(3): 222-233.
- Ravagnan, L., T. Roumier y G. Kroemer** (2002). Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* **192**(2): 131-137.
- Ravera, S., I. Panfoli, M. G. Aluigi, D. Calzia y A. Morelli** (2011). Characterization of Myelin Sheath F(o)F(1)-ATP synthase and its regulation by IF(1). *Cell Biochem Biophys* **59**(2): 63-70.
- Reed, J. C.** (1997). Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**(6635): 773-776.
- Rehman, J.** (2010). Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells. *J Mol Med* **88**(10): 981-986.
- Rigo, P., P. Paulus, B. J. Kaschten, R. Hustinx, T. Bury, G. Jerusalem, T. Benoit y J. Foidart-Willems** (1996). Oncological applications of positron emission tomography with fluorine-18 fluoro-deoxyglucose. *Eur J Nucl Med* **23**(12): 1641-1674.
- Rilo, M. C., M. A. Cataldi de Flombaum y A. O. Stoppani** (1989). Isolation of the peptide inhibitor of H⁺-ATP synthase from *Crithidia fasciculata* and *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Int* **18**(2): 447-454.
- Ristow, M. y S. Schmeisser** (2011). Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **51**(2): 327-336.
- Ritov, V. B., E. V. Menshikova, J. He, R. E. Ferrell, B. H. Goodpaster y D. E. Kelley** (2005). Deficiency of subsarcolemmal mitochondria in obesity and type 2 diabetes. *Diabetes* **54**(1): 8-14.
- Rizzuto, R., S. Marchi, M. Bonora, P. Aguiari, A. Bononi, D. De Stefani, C. Giorgi, S. Leo, A. Rimesi, R. Siviero, E. Zecchini y P. Pinton** (2009). Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* **1787**(11): 1342-1351.
- Rizzuto, R. y T. Pozzan** (2006). Microdomains of intracellular Ca²⁺: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* **86**(1): 369-408.

- Rondelez, Y., G. Tresset, T. Nakashima, Y. Kato-Yamada, H. Fujita, S. Takeuchi y H. Noji (2005). Highly coupled ATP synthesis by F1-ATPase single molecules. *Nature* 433(7027): 773-777.
- Roth, S., P. Franken, W. van Veelen, L. Blonden, L. Raghoebir, B. Beverloo, E. van Drunen, E. J. Kuipers, R. Rottier, R. Fodde y R. Smits (2009). Generation of a tightly regulated doxycycline-inducible model for studying mouse intestinal biology. *Genesis* 47(1): 7-13.
- Rouslin, W. (1987). The mitochondrial adenosine 5'-triphosphatase in slow and fast heart rate hearts. *Am J Physiol* 252(3 Pt 2): H622-627.
- Rouslin, W. (1991). Regulation of the mitochondrial ATPase in situ in cardiac muscle: role of the inhibitor subunit. *J Bioenerg Biomembr* 23(6): 873-888.
- Rouslin, W. y C. W. Broge (1993). Factors affecting the species-homologous and species-heterologous binding of mitochondrial ATPase inhibitor, IF1, to the mitochondrial ATPase of slow and fast heart-rate hearts. *Arch Biochem Biophys* 303(2): 443-450.
- Rouslin, W. y C. W. Broge (1996). Isoform-independent heart rate-related variation in cardiac myofibrillar Ca(2+)-activated Mg(2+)-ATPase activity. *Am J Physiol* 270(5 Pt 1): C1271-1276.
- Rouslin, W., C. W. Broge y I. L. Grupp (1990). ATP depletion and mitochondrial functional loss during ischemia in slow and fast heart-rate hearts. *Am J Physiol* 259(6 Pt 2): H1759-1766.
- Rouslin, W., G. D. Frank y C. W. Broge (1995). Content and binding characteristics of the mitochondrial ATPase inhibitor, IF1, in the tissues of several slow and fast heart-rate homeothermic species and in two poikilotherms. *J Bioenerg Biomembr* 27(1): 117-125.
- Rowland, A. A. y G. K. Voeltz (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13(10): 607-625.
- Rozen, S. y H. Skaletsky (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.
- Saddar, S., M. K. Dienhart y R. A. Stuart (2008). The F1F0-ATP synthase complex influences the assembly state of the cytochrome bc1-cytochrome oxidase supercomplex and its association with the TIM23 machinery. *J Biol Chem* 283(11): 6677-6686.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* 14(3): 255-274.
- Sah, J. F., C. Kumar y P. Mohanty (1993). pH dependent conformational changes modulate functional activity of the mitochondrial ATPase inhibitor protein. *Biochem Biophys Res Commun* 194(3): 1521-1528.
- Sambrook, J. y D. W. Russell (2001). "Molecular cloning. A Laboratory manual" New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Martin, N., A. M. Cervera, C. Cordova, D. Covarello, K. J. McCreath y B. G. Galvez (2011). Mitochondria determine the differentiation potential of cardiac mesoangioblasts. *Stem Cells* 29(7): 1064-1074.

- Sanchez-Arago, M. y J. M. Cuezva** (2011). The bioenergetic signature of isogenic colon cancer cells predicts the cell death response to treatment with 3-bromopyruvate, iodoacetate or 5-fluorouracil. *J Transl Med* 9: 19.
- Sanchez-Arago, M., M. Chamorro y J. M. Cuezva** (2010). Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis* 31(4): 567-576.
- Sanchez-Arago, M., L. Formentini y J. M. Cuezva** (2013a). Mitochondria-mediated energy adaption in cancer: the H(+)-ATP synthase-gear switch of metabolism in human tumors. *Antioxid Redox Signal* 19(3): 285-298.
- Sanchez-Arago, M., L. Formentini, J. Garcia-Bermudez y J. M. Cuezva** (2012). IF1 reprograms energy metabolism and signals the oncogenic phenotype in cancer. *Cell Cycle* 11(16): 2963-2964.
- Sanchez-Arago, M., L. Formentini, I. Martinez-Reyes, J. Garcia-Bermudez, F. Santacatterina, L. Sanchez-Cenizo, I. M. Willers, M. Aldea, L. Najera, A. Juarranz, E. C. Lopez, J. Clofent, C. Navarro, E. Espinosa y J. M. Cuezva** (2013b). Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in human cancers. *Oncogenesis* 2: e46.
- Sanchez-Arago, M., J. Garcia-Bermudez, I. Martinez-Reyes, F. Santacatterina y J. M. Cuezva** (2013c). Degradation of IF1 controls energy metabolism during osteogenic differentiation of stem cells. *EMBO Rep* 14(7): 638-644.
- Santamaria, G., M. Martinez-Diez, I. Fabregat y J. M. Cuezva** (2006). Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* 27(5): 925-935.
- Santos, R., S. Lefevre, D. Sliwa, A. Seguin, J. M. Camadro y E. Lesuisse** (2010). Friedreich ataxia: molecular mechanisms, redox considerations, and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal* 13(5): 651-690.
- Satrústegui, J., B. Pardo y A. Del Arco** (2007). Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol Rev* 87(1): 29-67.
- Scorrano, L., M. Ashiya, K. Buttle, S. Weiler, S. A. Oakes, C. A. Mannella y S. J. Korsmeyer** (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2(1): 55-67.
- Schaefer, A. M., R. McFarland, E. L. Blakely, L. He, R. G. Whittaker, R. W. Taylor, P. F. Chinnery y D. M. Turnbull** (2008). Prevalence of mitochondrial DNA disease in adults. *Ann Neurol* 63(1): 35-39.
- Schagger, H. y T. G. Ohm** (1995). Human diseases with defects in oxidative phosphorylation. 2. F1F0 ATP-synthase defects in Alzheimer disease revealed by blue native polyacrylamide gel electrophoresis. *Eur J Biochem* 227(3): 916-921.

- Schagger, H. y K. Pfeiffer (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19(8): 1777-1783.
- Schapira, A. H. (2012). Mitochondrial diseases. *Lancet* 379(9828): 1825-1834.
- Schapira, A. H., V. M. Mann, J. M. Cooper, D. Dexter, S. E. Daniel, P. Jenner, J. B. Clark y C. D. Marsden (1990). Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55(6): 2142-2145.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil y Z. Elazar (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* 26(7): 1749-1760.
- Schnizer, R., G. Van Heeke, D. Amaturio y S. M. Schuster (1996). Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F1-ATPase inhibitor protein. *Biochim Biophys Acta* 1292(2): 241-248.
- Schonig, K., F. Schwenk, K. Rajewsky y H. Bujard (2002). Stringent doxycycline dependent control of CRE recombinase in vivo. *Nucleic Acids Res* 30(23): e134.
- Schreck, R. y P. A. Baeuerle (1991). A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol* 1(2-3): 39-42.
- Schriner, S. E., N. J. Linford, G. M. Martin, P. Treuting, C. E. Ogburn, M. Emond, P. E. Coskun, W. Ladiges, N. Wolf, H. Van Remmen, D. C. Wallace y P. S. Rabinovitch (2005). Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308(5730): 1909-1911.
- Schulz, T. J., R. Thierbach, A. Voigt, G. Drewes, B. Mietzner, P. Steinberg, A. F. Pfeiffer y M. Ristow (2006). Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited. *J Biol Chem* 281(2): 977-981.
- Schwerzmann, K. y P. L. Pedersen (1986). Synthesis and use of an azido-labeled form of the ATPase inhibitor peptide of rat liver mitochondria. *Methods Enzymol* 126: 660-666.
- Seniuk, N. A., W. G. Tatton y C. E. Greenwood (1990). Dose-dependent destruction of the cerebellar-cortical and nigral-striatal projections by MPTP. *Brain Res* 527(1): 7-20.
- Shah, D. I., N. Takahashi-Makise, J. D. Cooney, L. Li, I. J. Schultz, E. L. Pierce, A. Narla, A. Seguin, S. M. Hattangadi, A. E. Medlock, N. B. Langer, T. A. Dailey, S. N. Hurst, D. Faccenda, J. M. Wiwczar, S. K. Heggers, G. Vogin, W. Chen, C. Chen, D. R. Campagna, C. Brugnara, Y. Zhou, B. L. Ebert, N. N. Danial, M. D. Fleming, D. M. Ward, M. Campanella, H. A. Dailey, J. Kaplan y B. H. Paw (2012). Mitochondrial Atpif1 regulates haem synthesis in developing erythroblasts. *Nature* 491(7425): 608-612.
- Sheftel, A., O. Stehling y R. Lill (2010). Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends Endocrinol Metab* 21(5): 302-314.

- Shen, L., L. Zhi, W. Hu y M. X. Wu** (2009). IEX-1 targets mitochondrial F1Fo-ATPase inhibitor for degradation. *Cell Death Differ* 16(4): 603-612.
- Shi, P., J. Gal, D. M. Kwinter, X. Liu y H. Zhu** (2010). Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1802(1): 45-51.
- Shin, Y. K., B. C. Yoo, H. J. Chang, E. Jeon, S. H. Hong, M. S. Jung, S. J. Lim y J. G. Park** (2005). Down-regulation of mitochondrial F1F0-ATP synthase in human colon cancer cells with induced 5-fluorouracil resistance. *Cancer Res* 65(8): 3162-3170.
- Shin, Y. K., B. C. Yoo, Y. S. Hong, H. J. Chang, K. H. Jung, S. Y. Jeong y J. G. Park** (2009). Upregulation of glycolytic enzymes in proteins secreted from human colon cancer cells with 5-fluorouracil resistance. *Electrophoresis* 30(12): 2182-2192.
- Shirendeb, U. P., M. J. Calkins, M. Manczak, V. Anekonda, B. Dufour, J. L. McBride, P. Mao y P. H. Reddy** (2012). Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1 impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 21(2): 406-420.
- Silva, J. P., M. Kohler, C. Graff, A. Oldfors, M. A. Magnuson, P. O. Berggren y N. G. Larsson** (2000). Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet* 26(3): 336-340.
- Simoneau, J. A., S. R. Colberg, F. L. Thaete y D. E. Kelley** (1995). Skeletal muscle glycolytic and oxidative enzyme capacities are determinants of insulin sensitivity and muscle composition in obese women. *FASEB J* 9(2): 273-278.
- Smith, A. C. y A. J. Robinson** (2011). A metabolic model of the mitochondrion and its use in modeling diseases of the tricarboxylic acid cycle. *BMC Syst Biol* 5: 102.
- Solaini, G., A. Baracca, E. Gabellieri y G. Lenaz** (1997). Modification of the mitochondrial F1-ATPase epsilon subunit, enhancement of the ATPase activity of the IF1-F1 complex and IF1-binding dependence of the conformation of the epsilon subunit. *Biochem J* 327 (Pt 2): 443-448.
- Son, K., S. Fujioka, T. Iida, K. Furukawa, T. Fujita, H. Yamada, P. J. Chiao y K. Yanaga** (2009). Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells. *Anticancer Res* 29(10): 3995-4003.
- Sorensen, L., M. Ekstrand, J. P. Silva, E. Lindqvist, B. Xu, P. Rustin, L. Olson y N. G. Larsson** (2001). Late-onset corticohippocampal neurodepletion attributable to catastrophic failure of oxidative phosphorylation in MILON mice. *J Neurosci* 21(20): 8082-8090.
- Sperl, W., P. Jesina, J. Zeman, J. A. Mayr, L. Demeirleir, R. VanCoster, A. Pickova, H. Hansikova, H. Houst'kova, Z. Krejcik, J. Koch, J. Smet, W. Muss, E. Holme y J. Houstek** (2006). Deficiency of mitochondrial ATP synthase of nuclear genetic origin. *Neuromuscul Disord* 16(12): 821-829.

- Srinivasan, S. y N. G. Avadhani** (2012). Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 53(6): 1252-1263.
- Stock, D., A. G. Leslie y J. E. Walker** (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286(5445): 1700-1705.
- Stokin, G. B., C. Lillo, T. L. Falzone, R. G. Brusch, E. Rockenstein, S. L. Mount, R. Raman, P. Davies, E. Masliah, D. S. Williams y L. S. Goldstein** (2005). Axonopathy and transport deficits early in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Science* 307(5713): 1282-1288.
- Strauss, M., G. Hofhaus, R. R. Schroder y W. Kuhlbrandt** (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27(7): 1154-1160.
- Strecker, V., Z. Wumaier, I. Wittig y H. Schagger** (2010). Large pore gels to separate mega protein complexes larger than 10 MDa by blue native electrophoresis: isolation of putative respiratory strings or patches. *Proteomics* 10(18): 3379-3387.
- Sun, J., D. Folk, T. J. Bradley y J. Tower** (2002). Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 161(2): 661-672.
- Tatuch, Y. y B. H. Robinson** (1993). The mitochondrial DNA mutation at 8993 associated with NARP slows the rate of ATP synthesis in isolated lymphoblast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 192(1): 124-128.
- Thierbach, R., T. J. Schulz, F. Isken, A. Voigt, B. Mietzner, G. Drewes, J. C. von Kleist-Retzow, R. J. Wiesner, M. A. Magnuson, H. Puccio, A. F. Pfeiffer, P. Steinberg y M. Ristow** (2005). Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice. *Hum Mol Genet* 14(24): 3857-3864.
- Tinel, H., J. M. Cancela, H. Mogami, J. V. Gerasimenko, O. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin y O. H. Petersen** (1999). Active mitochondria surrounding the pancreatic acinar granule region prevent spreading of inositol trisphosphate-evoked local cytosolic Ca(2+) signals. *EMBO J* 18(18): 4999-5008.
- Tomasetig, L., F. Di Pancrazio, D. A. Harris, I. Mavelli y G. Lippe** (2002). Dimerization of F0F1ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1. *Biochim Biophys Acta* 1556(2-3): 133-141.
- Tondera, D., S. Grandemange, A. Jourdain, M. Karbowski, Y. Mattenberger, S. Herzig, S. Da Cruz, P. Clerc, I. Raschke, C. Merkwirth, S. Ehses, F. Krause, D. C. Chan, C. Alexander, C. Bauer, R. Youle, T. Langer y J. C. Martinou** (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28(11): 1589-1600.
- Torraco, A., F. Diaz, U. D. Vempati y C. T. Moraes** (2009). Mouse models of oxidative phosphorylation defects: powerful tools to study the pathobiology of mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1793(1): 171-180.

- Trifunovic, A. (2006). Mitochondrial DNA and ageing. *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6): 611-617.
- Trifunovic, A., A. Hansson, A. Wredenberg, A. T. Rovio, E. Dufour, I. Khvorostov, J. N. Spelbrink, R. Wibom, H. T. Jacobs y N. G. Larsson (2005). Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(50): 17993-17998.
- Trifunovic, A., A. Wredenberg, M. Falkenberg, J. N. Spelbrink, A. T. Rovio, C. E. Bruder, Y. M. Bohlooly, S. Gidlof, A. Oldfors, R. Wibom, J. Tornell, H. T. Jacobs y N. G. Larsson (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 429(6990): 417-423.
- Trushina, E., R. B. Dyer, J. D. Badger, 2nd, D. Ure, L. Eide, D. D. Tran, B. T. Vrieze, V. Legendre-Guillemin, P. S. McPherson, B. S. Mandavilli, B. Van Houten, S. Zeitlin, M. McNiven, R. Aebersold, M. Hayden, J. E. Parisi, E. Seeberg, I. Dragatsis, K. Doyle, A. Bender, C. Chacko y C. T. McMurray (2004). Mutant huntingtin impairs axonal trafficking in mammalian neurons in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* 24(18): 8195-8209.
- Unwin, R. D., R. A. Craven, P. Harnden, S. Hanrahan, N. Totty, M. Knowles, I. Eardley, P. J. Selby y R. E. Banks (2003). Proteomic changes in renal cancer and co-ordinate demonstration of both the glycolytic and mitochondrial aspects of the Warburg effect. *Proteomics* 3(8): 1620-1632.
- Urlinger, S., U. Baron, M. Thellmann, M. T. Hasan, H. Bujard y W. Hillen (2000). Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(14): 7963-7968.
- Vahsen, N., C. Cande, J. J. Briere, P. Benit, N. Joza, N. Larochette, P. G. Mastroberardino, M. O. Pequignot, N. Casares, V. Lazar, O. Feraud, N. Debili, S. Wissing, S. Engelhardt, F. Madeo, M. Piacentini, J. M. Penninger, H. Schagger, P. Rustin y G. Kroemer (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J* 23(23): 4679-4689.
- Valcarce, C., R. M. Navarrete, P. Encabo, E. Loeches, J. Satrustegui y J. M. Cuezva (1988). Postnatal development of rat liver mitochondrial functions. The roles of protein synthesis and of adenine nucleotides. *J Biol Chem* 263(16): 7767-7775.
- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. Cronin, M. Mazur y J. Telser (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39(1): 44-84.
- van Raaij, M. J., G. L. Orriss, M. G. Montgomery, M. J. Runswick, I. M. Fearnley, J. M. Skehel y J. E. Walker (1996). The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence. *Biochemistry* 35(49): 15618-15625.
- van Waveren, C., Y. Sun, H. S. Cheung y C. T. Moraes (2006). Oxidative phosphorylation dysfunction modulates expression of extracellular matrix--remodeling genes and invasion. *Carcinogenesis* 27(3): 409-418.

- Vazquez-Martin, A., B. Corominas-Faja, S. Cufi, L. Vellon, C. Oliveras-Ferraros, O. J. Menendez, J. Joven, R. Lupu y J. A. Menendez (2013). The mitochondrial H(+)-ATP synthase and the lipogenic switch: new core components of metabolic reprogramming in induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell Cycle* 12(2): 207-218.
- Vazquez-Memije, M. E., S. Shanske, F. M. Santorelli, P. Kranz-Eble, E. Davidson, D. C. DeVivo y S. DiMauro (1996). Comparative biochemical studies in fibroblasts from patients with different forms of Leigh syndrome. *J Inherit Metab Dis* 19(1): 43-50.
- Venard, R., D. Brethes, M. F. Giraud, J. Vaillier, J. Velours y F. Haraux (2003). Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochemistry* 42(24): 7626-7636.
- Verna, L., J. Whysner y G. M. Williams (1996). N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 71(1-2): 57-81.
- Vo, T. D., H. J. Greenberg y B. O. Palsson (2004). Reconstruction and functional characterization of the human mitochondrial metabolic network based on proteomic and biochemical data. *J Biol Chem* 279(38): 39532-39540.
- Vuorinen, K., K. Ylitalo, K. Peuhkurinen, P. Raatikainen, A. Ala-Rami y I. E. Hassinen (1995). Mechanisms of ischemic preconditioning in rat myocardium. Roles of adenosine, cellular energy state, and mitochondrial F1F0-ATPase. *Circulation* 91(11): 2810-2818.
- Walker, J. E. (1994). The regulation of catalysis in ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 4(6): 912-918.
- Walker, J. E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans* 41(1): 1-16.
- Walker, J. E. y V. K. Dickson (2006). The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6): 286-296.
- Walker, J. E., N. J. Gay, S. J. Powell, M. Kostina y M. R. Dyer (1987). ATP synthase from bovine mitochondria: sequences of imported precursors of oligomycin sensitivity conferral protein, factor 6, and adenosinetriphosphatase inhibitor protein. *Biochemistry* 26(26): 8613-8619.
- Wall, R. J. (2001). Pronuclear microinjection. *Cloning Stem Cells* 3(4): 209-220.
- Wallace, D. C. (2005). A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 39: 359-407.
- Wang, J., H. Wilhelmsson, C. Graff, H. Li, A. Oldfors, P. Rustin, J. C. Bruning, C. R. Kahn, D. A. Clayton, G. S. Barsh, P. Thoren y N. G. Larsson (1999). Dilated cardiomyopathy and atrio-ventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat. Genet.* 21(1): 133-137.
- Wang, S., L. Polo-Parada y L. T. Landmesser (2009a). Characterization of rhythmic Ca²⁺ transients in early embryonic chick motoneurons: Ca²⁺ sources and effects of altered activation of transmitter receptors. *J Neurosci* 29(48): 15232-15244.

- Wang, T., C. Marquardt y J. Foker** (1976). Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature* 261(5562): 702-705.
- Wang, X., B. Su, H. G. Lee, X. Li, G. Perry, M. A. Smith y X. Zhu** (2009b). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29(28): 9090-9103.
- Warburg, O.** (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124(3215): 269-270.
- Warburg, O.** (1956b). On the origin of cancer cells. *Science* 123(3191): 309-314.
- Weber, J.** (2006). ATP synthase: subunit-subunit interactions in the stator stalk. *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1162-1170.
- Weber, J. y A. E. Senior** (2003). ATP synthesis driven by proton transport in F1F0-ATP synthase. *FEBS Lett* 545(1): 61-70.
- West, A. P., I. E. Brodsky, C. Rahner, D. K. Woo, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, M. C. Walsh, Y. Choi, G. S. Shadel y S. Ghosh** (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 472(7344): 476-480.
- Westermann, B.** (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(12): 872-884.
- Wharton, D. C. y A. Tzagoloff** (1974). "Cytochrome Oxidase from Beef Heart Mitochondria". H. U. Bergmeyer Bergmeyer: Methods of Enzymatic Analysis Series New York, Accademic Press.
- Willers, I. M., I. Martinez-Reyes, M. Martinez-Diez y J. M. Cuezva** (2012). miR-127-5p targets the 3'UTR of human beta-F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *Biochim Biophys Acta* 1817(5): 838-848.
- Wittig, I., R. Carrozzo, F. M. Santorelli y H. Schagger** (2006). Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1757(9-10): 1066-1072.
- Wittig, I. y H. Schagger** (2008). Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8): 592-598.
- Wittig, I. y H. Schagger** (2009). Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1787(6): 672-680.
- Wredenberg, A., R. Wibom, H. Wilhelmsson, C. Graff, H. H. Wiener, S. J. Burden, A. Oldfors, H. Westerblad y N. G. Larsson** (2002). Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23): 15066-15071.
- Xiao, X., J. Yang, R. Li, S. Liu, Y. Xu, W. Zheng, Y. Yi, Y. Luo, F. Gong, H. Peng, M. Pei, M. Deng y G. Zhang** (2013). Deregulation of mitochondrial ATPsyn-beta in acute myeloid leukemia cells and with increased drug resistance. *PLoS One* 8(12): e83610.
- Yamada, E. W. y N. J. Huzel** (1989). Calcium-binding ATPase inhibitor protein of bovine heart mitochondria. Role in ATP synthesis and effect of Ca²⁺. *Biochemistry* 28(25): 9714-9718.
- Yamada, E. W. y N. J. Huzel** (1992). Distribution of the ATPase inhibitor proteins of mitochondria in mammalian tissues including fibroblasts from a patient with Luft's disease. *Biochim Biophys Acta* 1139(1-2): 143-147.

- Yoshida, M., E. Muneyuki y T. Hisabori** (2001). ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(9): 669-677.
- Yu, C., Y. Chen, G. W. Cline, D. Zhang, H. Zong, Y. Wang, R. Bergeron, J. K. Kim, S. W. Cushman, G. J. Cooney, B. Atcheson, M. F. White, E. W. Kraegen y G. I. Shulman** (2002). Mechanism by which fatty acids inhibit insulin activation of insulin receptor substrate-1 (IRS-1)-associated phosphatidylinositol 3-kinase activity in muscle. *J Biol Chem* 277(52): 50230-50236.
- Zanotti, F., A. Gnani, R. Mangiullo y S. Papa** (2009). Effect of the ATPase inhibitor protein IF1 on H⁺ translocation in the mitochondrial ATP synthase complex. *Biochem Biophys Res Commun* 384(1): 43-48.
- Zanotti, F., F. Guerrieri, Y. W. Che, R. Scarfo y S. Papa** (1987). Proton translocation by the H⁺-ATPase of mitochondria. Effect of modification by monofunctional reagents of thiol residues in F₀ polypeptides. *Eur J Biochem* 164(3): 517-523.
- Zanotti, F., G. Raho, A. Gaballo y S. Papa** (2004). Inhibitory and anchoring domains in the ATPase inhibitor protein IF1 of bovine heart mitochondrial ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr* 36(5): 447-457.
- Zanotti, F., G. Raho, R. Vuolo, A. Gaballo, F. Papa y S. Papa** (2000). Functional domains of the ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria. *FEBS Lett* 482(1-2): 163-166.
- Zhang, C., M. Lin, R. Wu, X. Wang, B. Yang, A. J. Levine, W. Hu y Z. Feng** (2011). Parkin, a p53 target gene, mediates the role of p53 in glucose metabolism and the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(39): 16259-16264.
- Zhou, J., L. Huang, L. Liu y J. Chen** (2009). Enhancement of pyruvate productivity by inducible expression of a F₀F₁-ATPase inhibitor INH1 in *Torulopsis glabrata* CCTCC M202019. *J Biotechnol* 144(2): 120-126.
- Zhou, R., A. S. Yazdi, P. Menu y J. Tschopp** (2011). A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* 469(7329): 221-225.
- Zhou, S., S. Kachhap, W. Sun, G. Wu, A. Chuang, L. Poeta, L. Grumbine, S. K. Mithani, A. Chatterjee, W. Koch, W. H. Westra, A. Maitra, C. Glazer, M. Carducci, D. Sidransky, T. McFate, A. Verma y J. A. Califano** (2007). Frequency and phenotypic implications of mitochondrial DNA mutations in human squamous cell cancers of the head and neck. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(18): 7540-7545.
- Zimmers, T. A., X. Jin, J. C. Gutierrez, C. Acosta, I. H. McKillop, R. H. Pierce y L. G. Koniaris** (2008). Effect of in vivo loss of GDF-15 on hepatocellular carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 134(7): 753-759.
- Zu, X. L. y M. Guppy** (2004). Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction. *Biochem Biophys Res Commun* 313(3): 459-465.

ANEXO I
Material adicional

ANEXO I

1. OTRAS FUNCIONES DE LA MITOCONDRIA.

Se dice que las mitocondrias son las fábricas energéticas de la célula. Ciertamente, esta es una función fundamental de las mitocondrias, pero no la única ni la más importante. A continuación se exponen las funciones mitocondriales más importantes más allá de la producción de ATP.

1.1. Metabolismo celular

Las mitocondrias son los centros metabólicos de la célula, no sólo a nivel energético. Además de ser los principales productores de ATP y NADH, en la mitocondria tienen lugar unas 200 reacciones metabólicas (Vo y cols., 2004; Smith y cols., 2011) que regulan el nivel celular de distintos metabolitos, aminoácidos y cofactores enzimáticos (Nelson y cols., 2004). Una de las rutas centrales del metabolismo celular, el **ciclo de Krebs**, sucede en el interior de la mitocondria (Figura A1). Este ciclo, oxida el acetil-CoA generado a partir de moléculas energéticas (glucosa, ácidos grasos y algunos aminoácidos) en CO₂, generando NADH y FADH₂ (Figura A1). Además, algunos de sus intermediarios del ciclo son precursores biosintéticos de aminoácidos y nucleótidos (oxalacetato y α -cetoglutarato), ácidos grasos y esteroides (citrato), porfirinas (succinil-CoA) y, en tejidos gluconeogénicos, glucosa (oxalacetato o piruvato) (Figura A1). El acetil-CoA puede provenir del piruvato generado en el citosol, que entra en la mitocondria (Figura A1). Sin embargo, este piruvato puede ser también transformado en lactato por la lactato deshidrogenasa (LDH) en el citosol, regenerando el NAD⁺ necesario para la glucólisis (Figura A1). También existen reacciones anapleróticas que reponen los intermediarios del ciclo que se han desviado a rutas biosintéticas, como la conversión de piruvato en malato por la enzima málica o en oxalacetato por la piruvato carboxilasa (PC) en hígado. Otra ruta anaplerótica importante es la glutaminólisis que proporciona glutamato para reponer α -cetoglutarato y NADPH (Figura A1).

La mitocondria es, además, el compartimento celular donde tiene lugar preferentemente el catabolismo de ácidos grasos. En este proceso, los ácidos grasos, que entran a la mitocondria como acilcarnitinas, sufren procesos sucesivos de **β -oxidación** que liberan acetil-CoA y NADH/FADH₂. Esta ruta genera el 80 % de la energía necesaria en el corazón o el hígado de mamíferos en condiciones fisiológicas (Nelson y cols., 2004). Además, el acetil-CoA puede entrar en el ciclo de Krebs para su completa oxidación, produciendo más energía. En el caso de las mitocondrias hepáticas, el acetil-CoA puede, además, transformarse en cuerpos cetónicos para su uso como fuente de energía en otros tejidos. Esta ruta, la **cetogénesis**, permite que la oxidación de ácidos grasos continúe cuando la disponibilidad de glucosa es limitada. En estos casos, el acetil-CoA no se oxida en el ciclo de Krebs porque sus intermediarios se están utilizando para la gluconeogénesis. La cetogénesis impide que se acumule más acetil-CoA que inhibiría la β -oxidación y al mismo tiempo

provee de un sustrato energético a tejidos extra-hepáticos que no pueden utilizar los ácidos grasos, como el cerebro (Nelson y cols., 2004).

La mitocondria también participa en el **metabolismo de los aminoácidos**, proporcionando precursores biosintéticos (intermediarios del ciclo de Krebs) y catabolizando el exceso de amonio mediante el **ciclo de la urea** en el hígado (Nelson y cols., 2004). Este ciclo es vital para la conversión del exceso de nitrógeno en forma de urea, producto excretable por los riñones. Las dos primeras reacciones del ciclo suceden en el interior de la mitocondria, a partir del amonio vehiculado al interior de la mitocondria por la glutamina o alanina (desde otras partes del organismo) y el glutamato (desde el citosol).

El inicio de la **síntesis del grupo hemo** a partir de succinil-CoA (intermediario del ciclo de Krebs) y su finalización también ocurre en las mitocondrias, especialmente, del hígado. Este grupo, actúa como portador de oxígeno en la mioglobina y hemoglobina y como portador de electrones en los citocromos, por lo que es esencial en la distribución y consumo de oxígeno así como en la detoxificación de sustancias tóxicas en el hígado por el citocromo P₄₅₀.

Por último, las mitocondrias también proporcionan el **acetil-CoA** (en forma de citrato) necesario para la síntesis de lípidos y ubiquinona y en ellas tiene lugar la síntesis de fosfolípidos, esteroides y cardiolipina.

1.2. Biosíntesis de centros Fe/S

En la última década, se ha descrito una nueva función de la mitocondria vital para la célula: la biosíntesis de proteínas ferrosulfurosas (Fe/S). Gracias a la capacidad de aceptar y donar electrones de los centros Fe/S, estas proteínas participan en procesos que requieren la transferencia de electrones (como los complejos respiratorios I, II o III), o en reacciones enzimáticas (como la aconitasa del ciclo de Krebs) o en el procesamiento y reparación de ácidos nucleicos (como la DNA primasa) (Sheftel y cols., 2010). El hecho de que este proceso biosintético esté presente en todos los organismos eucariotas y el papel clave que muchas de estas proteínas tienen en la viabilidad celular, ha llevado a señalar a la biosíntesis de proteínas Fe/S como la función más importante e indispensable de las mitocondrias (Lill y cols., 2012). La síntesis de todas las proteínas Fe/S celulares (mitocondriales, citosólicas o nucleares) sucede en las mitocondrias y aunque el proceso está lejos de ser completamente conocido, en los últimos años se ha ido definiendo el mecanismo y las proteínas implicadas [revisado en (Lill y cols., 2012)]. El ensamblaje y la exportación de grupos Fe/S mitocondriales participa también en la regulación de la homeostasis del hierro, manteniendo los niveles de hierro bajos y regulando su adquisición y distribución intracelular (Lill y cols., 2012): los reguladores post-transcripcionales IRP1 y IRP2 son proteínas Fe/S que cuando los niveles de Fe son bajos, o la síntesis de grupos Fe/S deficiente, se unen a UTR de mRNA con elementos de respuesta a hierro (*iron responsive elements*, IRE), estabilizando unos como la transferrina, (receptor que introduce hierro en la célula), o inhibiendo la traducción de otros, como la ferritina, (almacena el hierro en exceso en el citosol) o la ALAS2 (síntesis de hemo) (Lill y cols., 2012).

1.3. Señalización por calcio

La mitocondria interviene en otros procesos celulares, como la señalización por calcio [revisado en (Satrustegui y cols., 2007; Drago y cols., 2011)]. El calcio citoplasmático es un mensajero fundamental en la señalización de procesos como la proliferación, muerte celular, contracción, transcripción génica y modificación post-traducciona de proteínas iniciados por estímulos extracelulares (hormonas, neurotransmisores o factores de crecimiento) (Clapham, 2007). La concentración citoplasmática de este importante mensajero está finamente controlada mediante la regulación de la salida de calcio a través de la membrana plasmática y mediante la regulación de la entrada/salida desde los reservorios intracelulares de calcio, principalmente el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi.

Las mitocondrias también poseen la capacidad de almacenar calcio transitoriamente y liberarlo después [(Baughman y cols., 2011; De Stefani y cols., 2011; Drago y cols., 2011) y revisado recientemente en (Raffaello y cols., 2012)] interviniendo en la regulación de su concentración citoplasmática y, por tanto, en la señalización de calcio. Así, actúan como tampones, propagadores de picos de calcio o liberadores de calcio en regiones específicas de la célula gracias a su movilidad intracelular (Jouaville y cols., 1995; Boitier y cols., 1999; Tinel y cols., 1999; Rizzuto y cols., 2006; Contreras y cols., 2010) por lo que su participación es clave en procesos como la liberación de hormonas (Maechler y cols., 1997; Tinel y cols., 1999) o de neurotransmisores (David y cols., 1998; Wang y cols., 2009a). Además, la mitocondria participa en la homeostasia del calcio favoreciendo su liberación desde el retículo endoplásmico (Hajnóczky y cols., 1999), en los estrechos contactos que mantiene con este orgánulo (Rizzuto y cols., 2009).

Por otro lado, el calcio ejerce una función homeostática sobre la mitocondria, ya que activa tres enzimas claves del ciclo de Krebs (piruvato, α -cetoglutarato e isocitrato deshidrogenasas) (McCormack y cols., 1990) aumentando la síntesis de ATP (Jouaville y cols., 1999). Sin embargo, cuando los niveles de calcio en la matriz son muy elevados, se produce un colapso en $\Delta\Psi_m$ que puede inducir muerte celular (Giacomello y cols., 2007; Rasola y cols., 2011). Por lo tanto, la mitocondria también participa en la señalización de muerte celular mediada por calcio.

1.4. Señalización por ROS

Los complejos I y III de la CTE son los principales productores de $O_2^{\bullet-}$ y, por tanto, de H_2O_2 [ver sección 1.1.2 y Figura 2 (Murphy, 2009)], aunque también otras enzimas, principalmente deshidrogenasas, son capaces de producir ROS (Andreyev y cols., 2005). Estos oxidantes, especialmente H_2O_2 (Murphy y cols., 2011), modifican proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, iniciando cascadas de señalización diversas. Aunque numerosos estudios han relacionado los ROS con diversas patologías (diabetes, enfermedades neurodegenerativas, cáncer y enfermedades cardiovasculares por citar algunas) [revisado en (Valko y cols., 2007)] lo cierto es que estos agentes oxidantes desempeñan también un papel en la señalización fisiológica (Mittal y cols., 1977; Schreck y cols., 1991; Droge, 2002), siendo la intensidad de la señal la que determina la respuesta celular (Orrenius y

cols., 2007; Finkel, 2012). Una elevada señal de ROS puede disparar la respuesta de muerte por apoptosis, necrosis o autofagia, y por el contrario, un nivel moderado de ROS puede activar el programa de transcripción génica para proliferar (Orrenius y cols., 2007; Formentini y cols., 2012). Un aumento en la producción de ROS puede ser provocado por defectos genéticos en la CTE o inhibición de OXPHOS por hipoxia o agentes químicos, por ejemplo, que aumentan concomitantemente el $\Delta\Psi_m$.

Por otro lado, las mitocondrias de mamíferos cuentan con una importante red de defensa antioxidante que regula los niveles de ROS, principalmente la superóxido dismutasa (SOD2 o MnSOD) que detoxifica $O_2^{\cdot-}$ y la glutatión peroxidasa (GPx) y catalasa que detoxifican H_2O_2 y peróxidos orgánicos. Los ROS mitocondriales difunden al citosol, iniciando rutas de señalización, pero también ROS citosólicos pueden entrar en la mitocondria y ejercer aquí su acción o ser detoxificados. Dada la participación de las mitocondrias en la producción y detoxificación de ROS, no es de extrañar que estos orgánulos jueguen un papel clave en la señalización por ROS de procesos como la supervivencia y adaptación (Guzy y cols., 2005; Formentini y cols., 2012), inflamación (West y cols., 2011; Zhou y cols., 2011), autofagia (Scherz-Shouval y cols., 2007; Mathew y cols., 2009), proliferación y desarrollo (Ito y cols., 2004), señalización metabólica (Nemoto y cols., 2000; Droge, 2002) y muerte celular (Chandra y cols., 2000; Hamanaka y cols., 2010).

1.5. Muerte celular

La apoptosis es un proceso de muerte programada caracterizada por una reducción del volumen celular y nuclear, fragmentación del núcleo, formación de vesículas en la membrana plasmática y fagocitosis *in vivo*, entre otros eventos (Kroemer y cols., 2009). Este proceso es necesario para la correcta homeostasis y desarrollo del organismo, participa en el envejecimiento y permite eliminar células dañadas y/o potencialmente tumorigénicas.

La principal forma de apoptosis en vertebrados está mediada por la mitocondria, que sufre un proceso de permeabilización de la membrana externa mitocondrial (MOMP, *mitochondrial outer membrane permeabilization*) (Green y cols., 2004). Las proteínas de la familia Bcl-2 juegan un papel fundamental en la inducción (Bax, Bid, Bad) o represión (Bcl-XL, Bcl-2) del MOMP, aunque p53, proteínas de la maquinaria de fusión/fisión, metabolitos y Ca^{2+} pueden participar en el proceso. El MOMP produce una liberación de proteínas contenidas en el espacio intermembrana al citosol que acaba provocando la muerte de la célula, bien mediada por la activación de caspasas (tras la liberación de citocromo c), o por mecanismos caspasa-independientes (mediados por la liberación de AIF y EndoG) o por pérdida de funciones mitocondriales vitales para la supervivencia celular (Green y cols., 2004). En cualquier caso, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es inevitable, y con ello, el colapso de la funcionalidad de la mitocondria. El MOMP puede suceder acompañado o no de permeabilidad de la membrana interna que se produce por la apertura sostenida del PTP (*permeability transition pore*). Se cree que este megacanal se forma en los puntos de contacto entre la membrana interna y la externa y aunque su composición no

está todavía definida, parece implicar a proteínas de la membrana externa (VDAC), interna (ANT) y de la matriz (ciclofilina D) (Rasola y cols., 2011). El PTP, estimulado persistentemente por distintos factores (estado redox y energético, Ca^{2+} , pH o $\Delta\Psi_m$) produce la pérdida del $\Delta\Psi_m$, de ATP y de Ca^{2+} y un hinchamiento de la matriz que en última instancia rompe la membrana externa mitocondrial produciendo MOMP.

La ejecución del proceso de muerte celular apoptótica, además, requiere la actividad mitocondrial, en concreto, la fosforilación oxidativa (Dey y cols., 2000; Harris y cols., 2000; Park y cols., 2004). Por ejemplo, las proteínas citocromo c, AIF y subunidades de la ATP sintasa que participan en la fosforilación oxidativa tienen un papel relevante también en la muerte celular (Matsuyama y cols., 1998; Plas y cols., 2002; Vahsen y cols., 2004) y se ha descrito un papel del supresor de tumores p53 en la regulación del metabolismo energético (Zhang y cols., 2011). Recientemente se ha descrito que Bcl-xL, proteína que previene la apoptosis interacciona con $\beta\text{F1ATPasa}$ para regular la eficiencia del metabolismo energético (Alavian y cols., 2011) y parece que Bax necesita la H^+ -ATP sintasa para ejercer su función proapoptótica (Matsuyama y cols., 1998).

Los niveles ATP y ROS producidos por la mitocondria intervienen también en la activación/inhibición de apoptosis y otros tipos de muerte, como necrosis y autofagia. Así, la formación del apoptosoma requiere niveles altos de ATP mientras que niveles bajos de ATP señalizan necrosis (Golstein y cols., 2007) o autofagia (Levine y cols., 2008). Como se ha mencionado en el apartado anterior, la respuesta celular a ROS depende de su intensidad, pudiendo señalar muerte celular si los niveles son elevados o proliferación si son moderados (Orrenius y cols., 2007; Formentini y cols., 2012).

La H^+ -ATP sintasa (Matsuyama y cols., 1998; Santamaria y cols., 2006) es especialmente necesaria para la eficiente ejecución de la apoptosis. Así, se ha demostrado que una inhibición de la actividad de esta enzima con oligomicina impide la ejecución de la muerte celular mediada por ROS e inducida con estaurosporina al impedir la hiperpolarización y el aumento de ROS (Santamaria y cols., 2006) y que las células son más susceptibles a este tipo de muerte cuanto más dependientes son de la OXPHOS (Dey y cols., 2000; Kim y cols., 2002; Park y cols., 2004; Santamaria y cols., 2006). Recientemente se ha sugerido que el PTP está formado por dímeros a H^+ -ATPasa (Giorgio y cols., 2013) y que las subunidades c de la misma son necesarias para la apertura del canal (Bonora y cols., 2013).

En conclusión, sea cual sea el estímulo, el mecanismo de permeabilización o la cascada de señalización resultante, la mitocondria juega un papel fundamental en la regulación y ejecución del programa de muerte celular (Reed, 1997; Green, 1998; Kroemer y cols., 1998; Ravagnan y cols., 2002; Jaattela, 2004).

2. LA DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN PATOLOGÍA Y EN ENVEJECIMIENTO

Dada la importancia de las funciones y del comportamiento mitocondrial en la fisiología humana, no es de extrañar que las alteraciones mitocondriales, bien sean en su función, estructura

y/o dinámica, estén implicadas en el envejecimiento y en una gran cantidad de enfermedades que abarcan todos los ámbitos de la medicina: enfermedades neurodegenerativas, cardiomiopatías, síndrome metabólico, diabetes, obesidad y cáncer.

Estas disfunciones mitocondriales pueden ser consecuencia de mutaciones en el nDNA o mtDNA (Copeland, 2008) y a su vez, pueden ser mutaciones heredadas o espontáneas. Las enfermedades hereditarias mitocondriales representan un grupo heterogéneo de trastornos con diferentes manifestaciones en ocasiones multisistémicas y a veces tejido-específicas, como sordera, epilepsia, diabetes, miopatía, cardiomiopatía, ataxia, encefalopatía o tumores. La lista de mutaciones relacionadas con la mitocondria que producen enfermedades en humanos es extensa [revisado recientemente en (Schapira, 2012)] y afecta no sólo a los complejos respiratorios, si no también a otras proteínas relacionadas con la mitofagia y la fusión/fisión, por ejemplo.

Aunque se han descrito numerosos trastornos mitocondriales hereditarios, estas mutaciones, especialmente en el mtDNA, también pueden ser espontáneas como consecuencia del entorno o del envejecimiento. De hecho, se ha sugerido que el dramático aumento de enfermedades metabólicas y enfermedades degenerativas relacionadas con la edad (diabetes, cáncer, Alzheimer, o Parkinson) en los países industrializados está relacionado con el daño mutagénico acumulado en el mtDNA (Wallace, 2005).

Otros factores, además de las mutaciones, que pueden producir una disfunción mitocondrial son: una limitación de sustratos u oxígeno, daño oxidativo sobre componentes de la OXPHOS u otras proteínas fundamentales, la disipación del $\Delta\Psi_m$, bien por MOMP, PTP o proteínas desacoplantes y alteraciones en la dinámica mitocondrial (fusión/fisión y mitofagia). A continuación se explica la participación de la mitocondria en las principales patologías humanas y en el envejecimiento.

2.1. Enfermedades neurodegenerativas

El estudio de la etiología de las enfermedades neurodegenerativas, especialmente las relacionadas con la edad (Alzheimer, Parkinson, Huntington), tiene especial interés dado el incremento de su incidencia en países industrializados y a la escasa terapia efectiva de la que se dispone. Si bien no se puede señalar la disfunción mitocondrial como la causa iniciadora de este tipo de enfermedades, es significativa su participación en la patología (Mattson y cols., 2008) posiblemente por la importante función mitocondrial de las neuronas (tienen una capacidad glucolítica limitada).

La dinámica mitocondrial ha recibido atención en relación a este tipo de enfermedades ya que las mitocondrias están sujetas a un tráfico mitocondrial intenso entre el cuerpo y las dendritas de las neuronas. Es en las terminales pre y post-sinápticas donde se localizan la mayoría de estos orgánulos, para lo cual, deben fusionarse y fisiónarse y ser destruidas cuando dejan de ser funcionales (mitofagia). Se ha descrito una alteración en el tráfico axonal de mitocondrias en Alzheimer (Stokin y cols., 2005; Wang y cols., 2009b) y en modelos animales de Huntington (Trushina y cols., 2004) y esclerosis lateral amiotrófica (ALS, *amyotrophic lateral sclerosis*) (Shi y cols., 2010). En

Huntington, las mitocondrias aparecen fragmentadas y con una dinámica mitocondrial alterada (Pandey y cols., 2010; Shirendeb y cols., 2012) y la alteración de la mitofagia podría tener un papel en Parkinson, ya que las proteínas PINK1 y Parkin están implicadas en esta vía (Matsuda y cols., 2010). Otras anomalías mitocondriales han sido detectadas en Alzheimer, como alteraciones en el importe de proteínas mitocondriales (Devi y cols., 2006) y en Huntington, como disfunciones en la homeostasia mitocondrial del calcio, disminución de la respiración (Lim y cols., 2008) y daño oxidativo (Browne y cols., 1997).

Además, las enfermedades neurodegenerativas han sido relacionadas con deficiencias en complejos respiratorios, como el complejo I en Parkinson y Alzheimer (Schapira y cols., 1990; Greenamyre y cols., 2001; Lasagna-Reeves y cols., 2011), o en el complejo III (Kim y cols., 2000), IV (Parker y cols., 1990; Canevari y cols., 1999; Bosetti y cols., 2002) y V (Schagger y cols., 1995; Chandrasekaran y cols., 1997) en Alzheimer que inducen un aumento en el daño oxidativo que contribuye a la patogénesis de estas enfermedades. Además, se han encontrado haplogrupos en el mtDNA que predisponen a la enfermedad de Parkinson y al Alzheimer (Coskun y cols., 2012).

El daño oxidativo y la desregulación del calcio parece participar en la patología de otras enfermedades neurodegenerativas, como la neuropatía óptica de Leber (Patsi y cols., 2008) o el Alzheimer (Duchen, 2004).

Otras enfermedades neurodegenerativas cursan con intervención de la mitocondria, como la ataxia de Friedreich, producida por mutaciones el gen de la frataxina, proteína que interviene en la síntesis de grupos Fe/S mitocondriales (Santos y cols., 2010). La mutación no sólo afecta a la síntesis de proteínas Fe/S, como los complejos respiratorios, si no que parece intervenir en el daño oxidativo observado en esta enfermedad (Santos y cols., 2010).

2.2. Diabetes

La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica en la que el organismo no es capaz de atenuar la hiperglucemia tras la ingesta, bien por una falta de secreción de insulina pancreática (diabetes tipo 1) o bien por una resistencia de los tejidos a la captación insulino-dependiente de glucosa (diabetes tipo 2). La diabetes se manifiesta en muchas patologías mitocondriales y, de hecho, puede ser la consecuencia de una mutación en tRNAs mitocondriales (Maassen y cols., 2006) o en genes mitocondriales del núcleo (Silva y cols., 2000), produciendo un tipo de diabetes conocida como “diabetes mitocondrial”.

La participación de la mitocondria en la secreción de insulina está descrita desde hace tiempo (Ashcroft y cols., 1984). Básicamente, el aumento de ATP sintetizado por la mitocondria en respuesta a la entrada de glucosa en las células β , produce el cierre de los canales de K^+ dependientes de ATP en la membrana. Esto produce una despolarización y una entrada de Ca^{2+} masiva al citosol, que en última instancia produce la exocitosis de los gránulos de insulina (Ashcroft y cols., 1984). Además, la mitocondria tiene gran importancia en la funcionalidad de las células β pancreáticas. El característico patrón de expresión enzimático de las células β (la baja expresión de LDH y elevada

PC) proporciona metabolitos y NADH al citosol que coordinan el proceso de secreción de insulina en respuesta a glucosa (Jitrapakdee y cols., 2010). Además, posibilita la elevada actividad de las lanzaderas redox mitocondriales observada en esta patología (Eto y cols., 1999), necesarias para suplir la falta de NAD⁺ citosólico. Se han detectado una disminución en la expresión PC y otras de estas enzimas en islotes pancreáticos humanos con diabetes, lo que refleja la implicación de la mitocondria en esta enfermedad (Jitrapakdee y cols., 2010).

La diabetes tipo 2 es otra enfermedad de incidencia epidémica en el mundo occidental especialmente por su asociación con la obesidad. Aunque no se puede afirmar que sea la causa patológica de la enfermedad, la relación entre la disfunción mitocondrial y la diabetes tipo 2 está bien documentada [revisado en (Patti y cols., 2010)]. Se han detectado defectos en la OXPHOS en músculo (principal órgano sensible a la insulina) de pacientes obesos, y de pacientes con diabetes tipo 2, atribuidas a una reducción en la masa mitocondrial (Ritov y cols., 2005; Befroy y cols., 2007) y/o a defectos intrínsecos en el metabolismo mitocondrial (Simoneau y cols., 1995; Mootha y cols., 2003b; Patti y cols., 2003; Crunkhorn y cols., 2007; Mogensen y cols., 2007) al igual que en tejido adiposo blanco de pacientes obesos (Rong y cols., 2007), hecho que correlaciona con la resistencia a insulina. Por otro lado, la acumulación de lípidos en músculo y en hígado, altera el metabolismo mitocondrial produciendo una acumulación de acetil-CoA, ROS, ceramidas... que interfieren con la señalización insulínica (Yu y cols., 2002).

3.3. Envejecimiento

Debido al importante papel de las mitocondrias en el mantenimiento de la salud global del individuo parece lógico pensar en una relación entre la disfunción mitocondrial y el deterioro de las funciones vitales asociado al envejecimiento. De hecho, la mitocondria juega un papel en muchas de las enfermedades asociadas a la edad (Alzheimer, Parkinson, cáncer...), como hemos visto anteriormente, pero además, se discute su papel como agentes activos relacionados con la longevidad. Una de las pruebas más convincentes de la participación de la mitocondria en el envejecimiento es el fenotipo observado en el “ratón mutador” del laboratorio de Larsson (Trifunovic y cols., 2004; Trifunovic, 2006) que expresa una polimerasa γ (responsable de la replicación del mtDNA) mutada que introduce mutaciones en el mtDNA. Estos ratones tienen una vida reducida y muestran signos típicos de envejecimiento, como caída del pelo, osteoporosis, enfermedades cardíacas y reducción de la fertilidad.

Durante muchos años, se ha nominado a los ROS como los agentes que vinculan la mitocondria con el envejecimiento según la teoría de envejecimiento de los radicales libres acuñada por Harman (Harman, 1956). Varias evidencias parecen apoyar esta teoría, como por ejemplo, el aumento en la longevidad de modelos animales que sobre-expresan enzimas antioxidantes (Sun y cols., 2002; Schriener y cols., 2005). Sin embargo, esta teoría ha sido ampliamente debatida [críticamente revisado en (Alexeyev, 2009; Lapointe y cols., 2010)] e incluso contradicha (Ristow y cols., 2011) por distintas evidencias como, por ejemplo, el hecho de que el “ratón mutador” no muestra

un aumento de ROS o de estrés oxidativo (Trifunovic y cols., 2005). Otros autores afirman que si bien los ROS participa en la regulación del daño celular que aparece en el envejecimiento, estos agentes no son la causa primaria de este proceso (Hekimi y cols., 2011).

Las sirtuinas han sido otras de las grandes promesas en la búsqueda del secreto de la longevidad. Estas proteínas, inicialmente descritas como desacetilasas de histonas, ejercen una acción reguladora metabólica, especialmente en situaciones de ayuno y han sido relacionadas con el envejecimiento por su participación en los estudios de restricción calórica y longevidad (Houtkooper y cols., 2012). Sin embargo, el papel de las sirtuinas en el envejecimiento en mamíferos es discutido. En una investigación reciente, por ejemplo, la sobre-expresión de Sirt1 en ratones transgénicos no afectó a la longevidad aunque sí mostró un papel protector frente a enfermedades asociadas a la edad (cáncer y trastornos metabólicos) (Herranz y cols., 2010). Esta función protectora se debe, en parte, a su papel activador mitocondrial y regulador de proteínas mitocondriales que intervienen en estas patologías. Por ejemplo, SIRT1 activa PGC1 α (activador de biogénesis mitocondrial) y SIRT3, localizada en la mitocondria, regula enzimas de vías metabólicas fundamentales, como la oxidación de ácidos grasos (Hirschey y cols., 2010) y OXPHOS (Ahn y cols., 2008). Recientemente, se ha puesto de manifiesto la disociación de dímeros de ATP sintasa con el envejecimiento celular en un modelo de hongo (Daum y cols., 2013).

Aunque todavía estamos lejos de desentrañar las razones moleculares del envejecimiento, los estudios anteriores apuntan a una desregulación metabólica/oxidativa como fenómeno característico del envejecimiento. Ciertamente, con la edad, las células pierden capacidades metabólicas, son menos eficaces regulando respuestas de supervivencia y sufren más daño oxidativo. Puesto que las mitocondrias son los centros reguladores por excelencia del metabolismo, de ROS y de apoptosis de la célula, el papel de estos orgánulos en el envejecimiento promete ser relevante.

3. MODELOS DE ENFERMEDADES CON DISFUNCIÓN DE OXPHOS

Existe un creciente interés en la generación de modelos celulares y animales de interferencia con la OXPHOS para estudiar enfermedades asociadas a estos defectos. Estos modelos son herramientas potencialmente útiles en enfermedades debidas a defectos en complejos respiratorios tanto para caracterizar el mecanismo molecular de la patología como para desarrollar tratamientos hasta el momento inexistentes. Además, existen otras patologías de gran incidencia que cursan con una alteración mitocondria (ver sección 2 de este Anexo), por los que los modelos de interferencia con OXPHOS pueden ser de utilidad para explorar nuevas estrategias terapéuticas.

3.4. Modelos de enfermedades mitocondriales

Las enfermedades producidas por trastornos en la funcionalidad de la ATPasa y los desórdenes mitocondriales en general han sido, según los últimos estudios epidemiológicos, largamente

subestimados ya que en ocasiones no llegan a ser diagnosticados como tal (Sperl y cols., 2006; Schaefer y cols., 2008). Estas enfermedades pueden ser debidas a mutaciones en genes nucleares o mitocondriales que codifican para las distintas subunidades mitocondriales o factores de ensamblaje necesarios para la síntesis de los complejos respiratorios.

En la actualidad, no existe tratamiento contra estos defectos genéticos más allá del control de los síntomas, la eliminación de metabolitos tóxicos y la provisión de antioxidantes (DiMauro y cols., 2007). Esto es debido, en parte, al pobre conocimiento del mecanismo molecular que subyace en alteraciones crónicas mitocondriales por lo que la creación de modelos de estas enfermedades es fundamental para el avance en este sentido.

Las enfermedades debidas a mutaciones en el mtDNA son difíciles de modelar ya que este genoma no se puede modificar de forma estable. El único modelo estable creado con mutaciones mitocondriales es el “ratón mutador” (Trifunovic y cols., 2004), que presenta disfunciones en todos los complejos respiratorios (excepto el III) (Trifunovic y cols., 2005) y que por su fenotipo, es un excelente modelo de envejecimiento (ver sección 1.1.4.4). Los modelos animales mutantes se basan, generalmente, en genes del nDNA pero puesto que las deficiencias en complejos OXPHOS suelen ser letales en estado embrionario es necesario emplear modelos condicionales complejos, lo que explica el bajo número de modelos disponibles.

La mayoría de las enfermedades mitocondriales están relacionadas con una deficiencia de complejo I. Las deficiencias en este complejo producen síndrome de Leigh (encefalopatía fatal de la infancia), neurorretinopatía óptica hereditaria de Leber (LHON) y otras encefalopatías, miopatías y cardiomiopatías. Un gen frecuentemente mutado en pacientes con deficiencia de complejo I es *NDUFS4* que codifica en el nDNA para una subunidad ferro-sulfurosa del complejo I. El ratón KO homocigoto para este gen, produce un fenotipo semejante a la enfermedad de Leigh, con muerte prematura a las 7 semanas (Kruse y cols., 2008), de forma similar a los KO específicos de glía y neuronas (Quintana y cols., 2010) y han servido para desentrañar algunos de los mecanismos patológicos que subyacen en esta deficiencia. Otros modelos animales, como los deficientes en AIF, producen un déficit secundario de complejo I, con un fenotipo similar al observado en pacientes (Klein y cols., 2002; Joza y cols., 2005; Benit y cols., 2008).

El complejo respiratorio más extensamente estudiado en modelos de ratón es el complejo IV. Las deficiencias en complejo IV causan síndrome de Leigh, cardiomiopatías severas y encefalomiopatías y son debidas a mutaciones en factores de ensamblaje. Un modelo murino KO condicional en músculo para *COX10* reproduce la miopatía degenerativa observada en los pacientes y ha servido para correlacionar la función muscular y la actividad residual del complejo IV (Díaz y cols., 2005).

En el complejo III, existe una deficiencia secundaria conocida como síndrome GRACILE con afectación hepática y renal causada por una mutación en una chaperona necesaria para la incorporación de la proteína Rieske en el complejo III. Recientemente se ha desarrollado el único modelo animal disponible basándose en esta mutación que simula los síntomas de los pacientes

y permitirá el estudio patofisiológico y a búsqueda de tratamiento para esta enfermedad (Leveen y cols., 2011).

En el caso del complejo V, que trataremos más extensamente, las alteraciones en la H⁺-ATP sintasa más frecuentes descritas en pacientes son las mutaciones en el gen *ATP6* del mtDNA que codifica para la subunidad α , implicada en la translocación de protones [consultar (Kucharczyk y cols., 2009) para una extensa lista de las mutaciones encontradas y las referencias correspondientes]. Estas mutaciones alteran la funcionalidad de la subunidad o bien disminuyen su contenido celular por lo que interfieren con el acoplamiento del paso de protones en F_o con la síntesis de ATP en F₁. El cuadro clínico depende del grado de heteroplasmia presentándose, en los casos de elevada carga mutagénica, con neuropatía, ataxia y retinitis pigmentosa (síndrome NARP), síndrome de Leigh (DiMauro y cols., 2001), neurorretinopatía óptica hereditaria de Leber (LHON) o la neuropatía muscular conocida como enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Pitceathly y cols., 2012). En los pacientes con sintomatología más grave, la producción de ATP mitocondrial de los pacientes se ve comprometida (Tatuch y cols., 1993; Houstek y cols., 1995; Vazquez-Memije y cols., 1996; Carrozzo y cols., 2001; Jonckheere y cols., 2008) y se produce un aumento en el potencial de membrana mitocondrial y, como consecuencia, un aumento en ROS (Korshunov y cols., 1997; Geromel y cols., 2001), que posiblemente colabora junto con la depleción energética y la alteración del metabolismo a la patogénesis (Houstek y cols., 2006). Otras mutaciones descritas en subunidades de la ATP sintasa menos comunes se hallan en el gen *ATP8* (subunidad A6L, mDNA) (Jonckheere y cols., 2008) y *ATP5E* (subunidad épsilon, nDNA) (Mayr y cols., 2010) y factores de ensamblaje, como *ATP12* (nDNA) (Houstek y cols., 1999; De Meirleir y cols., 2004).

Existe un modelo en *E. coli* con la mutación de *ATP6* más común y más grave, T8993G, que produce una pérdida completa de la actividad ATPasa (Hartzog y cols., 1993). Sin embargo, la subunidad α mutante no es capaz de insertarse en el complejo ATP sintasa bacteriano, observación no encontrada en pacientes humanos (Carrozzo y cols., 2000). Esta diferencia es debida, posiblemente, a las diferencias en complejidad y estructura entre la enzima bacteriana y la humana, por lo que es preferible modelar esta mutación en un organismo fácilmente manipulable y con una ATPasa más semejante a la humana como es *S. cerevisiae*. El modelo de síndrome NARP en levadura presenta una reducción del 90% en la síntesis de ATP respecto a controles, con un crecimiento muy atenuado en glicerol pero sin afectación del ensamblaje o de la organización supramolecular del complejo (Rak y cols., 2007). Curiosamente, los mutantes también muestran una respiración disminuida debido a un menor contenido en complejo IV o COX, fenómeno observado también en el modelo de mutación T8993C en levaduras que, al igual que en humanos, presenta un fenotipo menos marcado (Kucharczyk y cols., 2009).

El único modelo animal de alteración de la ATP sintasa descrito hasta la fecha es de *Drosophila* (Celotto y cols., 2006). Las moscas con una *ATP6* mutada viven menos y sufren disfunción neuromuscular cuando son adultas y miopatía degenerativa (Celotto y cols., 2006; Celotto y cols., 2011). Además, sus mitocondrias presentan una anormal compartimentalización en forma de panal de

abeja y su función ATP sintética es prácticamente inexistente (Celotto y cols., 2006). Sin embargo, la tasa de respiración no varía entre moscas controles y mutantes, fenómeno observado también en cíbridos (Nijtmans y cols., 2001), lo que sugiere que las mitocondrias afectadas están funcionalmente desacopladas (Celotto y cols., 2006). Además, la ATPasa no es capaz de dimerizar y se observan menos supercomplejos que implican al complejo I en moscas mutantes (Celotto y cols., 2011). Este modelo ha demostrado que el mecanismo patogénico de estas alteraciones es más complejo que el defecto energético e implica una compensación metabólica dinámica (Celotto y cols., 2011). En efecto, las moscas mutantes compensan su reducida capacidad de producir ATP por OXPHOS incrementando otras vías metabólicas como la glucólisis y la cetogénesis en etapas tempranas asintomáticas. Sin embargo, con la edad, estos mecanismos compensatorios desaparecen y dan paso a la enfermedad (Celotto y cols., 2011).

Existen otros modelos animales que, si bien no reproducen una deficiencia directa de algún complejo respiratorio, afectan globalmente a la función mitocondrial y, por tanto, a OXPHOS (Torraco y cols., 2009). Entre ellos, merece especial mención los modelos de Tfam, proteína que interviene en la transcripción y en el mantenimiento del mtDNA. La ablación de Tfam es letal en estadios embrionarios debido a una depleción de mtDNA y el consecuente defecto en OXPHOS (Larsson y cols., 1998). En modelos KO condicionales y específicos de corazón y músculo, la cardiomiopatía y miopatía generada se corresponden con aquella observada en las patologías por defectos en OXPHOS mitocondriales (Wang y cols., 1999; Li y cols., 2000; Wredenberg y cols., 2002). El modelo MILON (*Mitochondrial Late-Onset Neurodegeneration*) creado por disrupción de Tfam en corteza e hipocampo desarrolla neurodegeneración a partir de los 4-5 meses con características semejantes a las patologías neurodegenerativas por mutación en el mtDNA (Sorensen y cols., 2001). Finalmente, los modelos KO de ANT (que regula el intercambio de nucleótidos en la mitocondria) en músculo y corazón sufren miopatía y cardiopatías así como altos niveles de lactato en sangre e intolerancia al ejercicio característicos de una alteración energética mitocondrial y que son síntomas de muchas enfermedades mitocondriales (Graham y cols., 1997) debidas a disfunción en OXPHOS. Además, la depleción energética produce altos niveles de ROS que, junto con la alteración del contenido en nucleótidos, contribuye a la acumulación de mutaciones en el mtDNA (Esposito y cols., 1999).

3.5. Modelos de otras enfermedades con afectación de OXPHOS

Como hemos visto en la sección 2 de este Anexo, existen varias enfermedades de importante incidencia en la que la disfunción mitocondrial participa en la causa y/o desarrollo de la patología. Los modelos de interferencia con OXPHOS que se describen a continuación permiten estudiar el papel de la mitocondria en estas enfermedades y descubrir nuevas dianas terapéuticas.

Un modelo de enfermedad de Parkinson se basa en la administración crónica y sistémica de rotenona, inhibidor del complejo I (Greenamyre y cols., 1999). Los ratones así tratados muestran una neurodegeneración asociada a la muerte selectiva de neuronas dopaminérgicas semejante

a la de los pacientes. La depleción de ATP producida por la inhibición de OXPHOS despolariza la neurona y altera la homeostasis del Ca^{2+} , que activa receptores de glutamato, aumentando la vulnerabilidad neuronal a este neurotransmisor y potenciando, a su vez, la disfunción mitocondrial (Greenamyre y cols., 1999). Sin embargo, la rotenona no muestra especificidad por las neuronas dopaminérgicas como el MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), otro inhibidor de complejo I frecuentemente utilizado como modelo de enfermedad de Parkinson (Dauer y cols., 2003). Este modelo, desarrollado en ratones y en monos (Forno y cols., 1986; Seniuk y cols., 1990) ha permitido estudiar la cascada molecular que se produce tras la muerte de las neuronas dopaminérgicas y es el estándar utilizado para testar nuevas terapias antiparkinsonianas (Dauer y cols., 2003). Otro modelo de Parkinson relacionado con una deficiente función mitocondrial es el modelo condicional KO de Tfam en neuronas dopaminérgicas llamado ratón MitoPark (Ekstrand y cols., 2007). Este modelo reproduce la pérdida de neuronas dopaminérgicas, la progresiva afectación del sistema locomotor y la aparición de cuerpos de Lewy con la edad característico de la enfermedad. Otro modelo generado por la expresión de la enzima de restricción del mtDNA PstI en neuronas dopaminérgicas de ratón produce depleción de mtDNA y deficiencia en OXPHOS, produciendo un fenotipo parkinsoniano (Pickrell y cols., 2011). Tfam también ha sido utilizado para generar un modelo de diabetes. Los ratones Tfam^{-/-} en páncreas muestran muchas de las características de las enfermedades mitocondriales asociadas a diabetes mellitus, como la insulinopenia y daño en las células β con la edad (Silva y cols., 2000).

5. FIGURAS Y TABLAS COMPLEMENTARIAS

Tabla A1: IF1 no correlaciona con las características clínico-patológicas de los tumores de mama. La expresión de IF1 fue dicotomizada en alta y baja tal y como se describe en Materiales y Métodos (sección 3.6.2). N: número de pacientes en cada grupo. %: porcentaje de pacientes en cada grupo. p: valor p según la prueba χ^2 de Pearson.

Características	IF1 bajo		IF1 alto		p
	N	%	N	%	
Edad					
<50	9	37,50	24	34,78	0,811
>50	15	62,50	45	65,22	
Histología					
Ductal	20	83,33	59	85,51	0,833
Lobulillar	3	12,50	6	8,70	
Otros	1	4,17	4	5,80	
Nº de nódulos					
0	10	41,67	35	50,72	0,655
1-3	8	33,33	22	31,88	
>3	6	25,00	12	17,39	
Tamaño					
<20mm	7	29,17	22	31,88	0,804
>20mm	17	70,83	47	68,12	
Estadío					
I	2	8,33	15	21,74	0,321
II	15	62,50	39	56,52	
III	7	29,17	15	21,74	
Grado					
N/R	4	12,12	10	14,49	0,429
1	1	3,03	7	10,14	
2	19	57,58	18	26,09	
3	9	27,27	34	49,28	
Receptor Hormonal					
Negativo	4	16,67	14	20,29	0,699
Positivo	20	83,333	55	79,7101	

Figura A2: Secuencia de las construcciones microinyectadas para generar ratones transgénicos. En gris, el elemento de respuesta a tetraciclinas (gris claro) y el promotor mínimo de citomegalovirus (gris oscuro). En amarillo, el cDNA de IF1 con el ORF en negrita, el codón de inicio y de terminación recuadrados y el codón mutado en H49K subrayado. Las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción SexA I, BsrB I y Drd I se indican en fondo azul, verde y rojo respectivamente.

```

ACCTGGTGTGCTGACTAATTGAGATGCATGCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGG
GACTTTCCACACCCTAACTGACACACTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAG
TGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACT
CCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAA
AAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACC
ACTCCCTATCAGTGATAGAGAAAAGTGAAAGTCGAGTTTACCACTCCCTATCAGTGATAGAG
AAAAGTGAAAGTCGAGCTCGGTACCCGGGTCGAGGTAGGCCGTGTACGGTGGGAGGCCTATA
TAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTGAC
CTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCCGAATTTCGAGCTCGGTACCCG
GGGATCCCGCGTCCGCGAGAGACTGCTTGTGCTGCGGCAGAGACGCCAGAGGTGCAGCTCCAG
CAGCAATGGCAGTGACGGCGTTGGCGGCGCGGACGTGGCTTGGCGTGTGGGGCGTGA
GGACCATGCAAGCCCCGAGGCTTCGGCTCGGATCAGTCCGAGAATGTCGACCGGGGGCG
CGGGCTCCATCCGGGAAGCCGGTGGGGCCTTCGGAAAGAGAGAGCAGGCTGAAGAGG
AACGATATTTCCGAGCACAGAGTAGAGAACTGGCAGCTTTGAAAAACACCATGA
AGAAGAAATCGTTCATCATAAGAAGGAGATTGAGCGTCTGCAGAAAGAAATTGAGCGC
CATAAGCAGAAGATCAAAATGCTAAACATGATGATTAAGTGCACACCGTGTGCCATAG
AATGGCACATGTCATTGCCCACTTCTGTGTAGACATGGTCTGTGTTTAACTAATATTTGTCTG
TGTGCTACTAACAGATTATAATAAATTGTCATCAGTGAAAAAAGAAAAAAGG
GCGGCCGCATCGATAAGCTTGTGCGACGATATCTCTAGAGCTGAGAACTTCAGGGTGAGTTG
GGGACCCTTGATTGTTCTTTCTTTTCGCTATTGTAAATTCATGTTATATGGAGGGGGCAAA
GTTTTCAGGGTGTGTTTGTAGAAATGGGAAGATGTCCCTTGATCACCATGGACCCTCATGATA
ATTTTGTCTTTCTTTCACTTTCTACTCTGTTGACAACCATGTCTCCTCTTATTTTCTTTTCA
CTGTAACCTTTTTCGTTAACTTTAGCTTGCATTTGTAACGAATTTTAAATTCACCTTCGTTT
ATTGTCAGATTGTAAGTACTTTCTCTAATCAGCTTTTTCAGGCAATCAGGGTAATTATA
TTGTACTTCAGCACAGTTTGTAGAGAACAATTGTTATAATTAATGATAAGGTAGAATATTTCT
GCATATAAATCTGGCTGGCGTGGAAATATTCTTATTGGTAGAAACAACATACATCCTGGTAA
TCATCCTGCCTTTCTCTTATGGTTACAATGATATACACTGTTTGAGATGAGGATAAAATACT
CTGAGTCCAAACCGGGCCCCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTACAGCTCC
TGGGCAACGTGCTGTTGTTGTGCTGTCTCATATTTTGGCAAAGAATTCACCTCCTCAGGTGC
AGGCTGCCTATCAGAAGGTGGTGGCTGGTGTGGCCAATGCCCTGGCTCACAAATACCACTGA
GATCTTTTCCCTCTGCCAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCT
GGGTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGGAATTTTGTGTCTCTCACTC
GGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTAAACATCAGAATGAGTATTTGGTTTAGAGTTT
GGCAACATATGCCATATGCTGGCTGCCATGAACAAAGGTGGCTATAAAGAGGTCATCAGTA
TATGAAACAGCCCCCTGCTGTCCATTCTTATTCCATAGAAAAGCCTTGACTTGAGGTTAGAT
TTTTTTTATATTTGTTTGTGTTATTTTCTTTAACATCCCTAAAAATTTTCTTACATGTTT
TACTAGCCAGATTTTCTCCTCTCCTGACTACTCCAGTCATAGCTGTCCCTCTTCTTATG
AACTCGACTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGGCGC
TCTTCCGCTTCTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGGCTGCGGCAGCGGTATCA
GCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAAC
TGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTT
CCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTC

```

ANEXO II

Publicaciones